اقیانوس‌شناسی/ سال نهم/ شماره ۳۶/ زمستان ۱۳۹۷/۷/۲۹-۲۳
DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1195

بررسی فعالیت ضدمیکروبی و شناسایی مولکولی *Nocardiopsis* sp. AHA2 از رسوبات ساحل بندر دیلم، خلیج فارس

حسن علی‌جانی[۱]، سهیلا مطرودی[۲*]، علی شرفی[۳]، اسحاق زمانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، ایران، پست الکترونیکی: hasanaalijani@gmail.com

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، ایران، پست الکترونیکی: s.matroodi@kmsu.ac.ir

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، پست الکترونیکی: sharafi.a@gmail.com

۴- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، ایران، پست الکترونیکی: isaac.zfr@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۶ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۵*

چکیده

هدف از این مقاله، بررسی فعالیت ضدمیکروبی و شناسایی مولکولی *Nocardiopsis* sp. AHA2 از رسوبات بستر ساحل دیلم است. نمونه‌برداری در مهرماه ۱۳۹۳ از رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم انجام شد. شناسایی جنس *Nocardiopsis* با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن 16Sr RNA انجام گردید. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی با استفاده از روش ایجاد چاهک صورت گرفت. نتایج آزمون افتراقی نشان دادند که *Nocardiopsis* sp. AHA2 برای آزمون‌های کاتالاز و گرم مثبت است و برای سایر آزمون‌ها منفی می‌باشد. همچنین نتایج آزمون SIM نشان دادند که این ایزوله غیرمتحرک است. از طرف دیگر، نتایج فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند که این ایزوله، نسبت به فعالیت ضدباکتریی، فعالیت ضدقارچی بهتری دارد. بررسی هاله مهار رشد در فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که متابولیت‌های ایزوله مورد مطالعه، تنها علیه باکتری‌های بیماری‌زای *Salmonella* sp. (قطر هاله، ۸/۸۶ میلی‌متر) و *Bacillus cereus* (قطر هاله، ۷/۹ میلی‌متر) موثر هستند. همچنین فعالیت ضدقارچی نشان داد که بیشترین اثر مهار رشد علیه قارچ بیماری‌زای *Aspergillus flavus* با قطر هاله، ۱۴/۴میلی‌متر است. بر اساس نتایج این تحقیق، رسوبات ساحل دیلم دارای گونه‌های کمیاب از گروه اکتینومیست‌ها هستند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *اکتینومیست‌های دریایی، نوکاردیوپسیس، فعالیت ضدمیکروبی، ساحل دیلم، خلیج فارس.*

۱. مقدمه

بررسی منشأ جغرافیایی ترکیبات فعال زیستی تا سال ۲۰۰۳ نشان می‌دهند که ۶۷٪ تولیدات طبیعی دریایی، از استرالیا، کارائیب، اقیانوس هند، ژاپن، دریای مدیترانه و قسمت‌های غربی اقیانوس آرام از اکتینومیست‌ها[۱] منشأ گرفته‌اند (Blunt et al.,

[1] Actinomycetes

2007). به نظر می‌رسد بعد از کشف اکتینومایسین[1] و آنزیم‌های مهم صنعتی در اکتینومیست‌ها، تولید بسیاری از ترکیبات زیست-فعال تجاری و عوامل ضدتومور، در این جانداران یافت شدند (Tanaka et al., 1990; Hamedi et al., 2015). حدود دو سوم از هزاران آنتی‌بیوتیک به طور طبیعی از این جانداران جداسازی شده (Takizawa et al., 1993) و همچنین بسیاری از این آنتی-بیوتیک‌ها از استرپتومایسس‌ها[2] بدست آمده‌اند (Doroghazi et al., 2013). بنابراین، این تولیدات طبیعی یک منبع بالقوه برای توسعه داروهای جدید هستند (Sivakumar et al., 2007).

از آنجایی‌که شرایط محیط دریا و خشکی تفاوت زیادی با هم دارند، گمان می‌رود که اکتینومیست‌های دریایی ویژگی‌های متفاوتی نسبت به همتایان زمینی خود داشته باشند. بنابراین، ممکن است انواع مختلفی از ترکیبات فعال زیستی تولید کنند. در واقع، محیط زیست دریایی، عملا یک منبع ناشناخته از اکتینومیست‌های متنوع (Stach et al., 2003; Bull et al., 2005) و در نتیجه متابولیت‌های جدید است (Fiedler et al., 2005; Jensen et al., 2005). نوکاردیوپسیس یکی از مهمترین منابع امیدبخش تولید ترکیبات فعال زیستی است. این مطالعه با هدف جداسازی ایزوله نوکاردیوپسیس و بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن با هدف یافتن ترکیبات فعال زیستی صورت گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه‌برداری و شناسایی

نمونه برداری در مهرماه ۱۳۹۳ صورت گرفت. رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم با موقعیت ۵۰ درجه و ۹ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۳ دقیقه شمالی تا عمق ۱۰ ساتی‌متری جمع‌آوری شدند. کلیه آنزیم‌ها و کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت Cinna Pure PR881614 از شرکت سیناژن تهیه شدند. نمونه‌برداری در مهرماه ۱۳۹۳ صورت گرفت. رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم با موقعیت ۵۰ درجه و ۹ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۳ دقیقه شمالی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در کیسه‌های پلی‌اتیلن استریل قرار داده شدند. اکتینومیست‌ها براساس روش جباری و همکاران (۲۰۱۶) جداسازی شدند (Jabari et al., 2016). برای جداسازی اکتینومیست-ها، نمونه‌های رسوبی به طور مکرر با آب دریای استریل رقیق شدند. بدین منظور، مقدار ۱۶ گرم رسوب با آب دریای استریل به حجم ml ۱۰۰ تهیه گردید و به مدت ۱ ساعت روی شیکر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. سپس از سوسپانسیون تهیه شده، رقت‌های مختلفی از ۱-۱۰ تا ۶-۱۰ و همچنین بدون رقت آماده گردید. به منظور رشد اکتینومیست‌ها از محیط کشت استارچ کازئین آگار (SCA) استفاده شد. شناسایی ریخت‌شناسی براساس شکل و رنگ کلنی و شکل میسلیوم‌ها با استفاده از فصل شناسایی باکتری‌ها از کتاب راهنمای برجی (Buchanan et al., 1974) انجام شد. شناسایی بیوشیمیایی ایزوله‌ها توسط روش‌های استاندارد انجام شد (Shrilling et al., 1966). در این مطالعه به منظور استخراج DNA، از کیت باکتری‌های گرم مثبت، Cinna Pure PR881614 استفاده گردید. پس از حصول اطمینان از خلوص و میزان DNA استخراج شده، برای تکثیر قطعه ژن موردنظر از یک جفت پرایمر یونیورسال 16S rDNA (Monciardini et al., 2002) که مشخصات آن در جدول ۱ آمده است، برای PCR قطعه‌ای به طول تقریبا۱۵۰۰ جفت باز استفاده شد (Monciardini et al., 2002). پس از انجام چند مرحله تکرار و تغییر در غلظت DNA الگو، MgCl2، دما، غلظت پرایمرهای F و R، بهترین شرایط برای واکنش PCR برگزیده شد (جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۱: مشخصات پرایمر مورد استفاده

نام پرایمر	توالی آغازگر	دمای اتصال
F27	F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′	۵۰°C
R1492	R: 5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′	۵۰°C

جدول ۲: مواد و مقادیر مصرفی در واکنش PCR

ماده	غلظت	مقدار برای واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA استخراجی	۱۰۰ نانوگرم	۲ میکرولیتر
آنزیم Taq polymerase	5U/µ	۰/۵ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰x	۲/۵ میکرولیتر
Mgcl2	۵۰ میلی مولار	۱ میکرولیتر
dNTP	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر ۱	۱۰ پیکومول	۲ میکرولیتر
آغازگر ۲	۱۰ پیکومول	۲ میکرولیتر
آب تزریقی	-	۱۴/۵ میکرولیتر

جدول ۳: چرخه حرارتی دستگاه PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل (چرخه)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	
الحاق	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۰
بسط	۷۲	۴۵ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

[1] Actinomycin
[2] Streptomyces

محصولات PCR با باند مطلوب جهت تعیین توالی، به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شدند. کروماتوگرام توالی‌های بدست آمده از شرکت ژن فن‌آوران ابتدا به وسیله نرم‌افزار Chromas، نسخه ۲/۶ بررسی و ویرایش شدند. رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6، نسخه ۶ انجام شد (Tamura et al., 2013).

۲-۲ بررسی فعالیت ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتری عصاره باکتریایی به روش انتشار دیسک، با استفاده از باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* و باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli*، *Klebsiella* sp.، *Proteus* sp. و *Salmonella* sp. انجام گرفت.فعالیت ضدقارچی به روش ایجاد چاهک، با استفاده از قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Aspergillus niger*، *Microsporum gypseum*، *Trichophyton mentagrophytes*، *Candida albicans* و *Penicillium* sp. انجام گرفت. باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی زنجان تهیه شدند. بدین جهت ابتدا باکتری در محیط القایی کشت داده شد و مطابق روش Jabari و همکاران (۲۰۱۶) محیط کشت حاوی متابولیت‌های ترشحی جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی استفاده شد.

برای بررسی فعالیت ضدقارچی از روش Matroodi و همکاران (۲۰۱۳) استفاده گردید. پس از کشت میکروب‌ها روی پلیت، توسط یک پنس استریل دیسک‌های استریل ۵ میلی‌متری به دقت در محیط آگار قرار داده شدند (Balouiri et al., 2016) و سپس محیط فیلتر شده باکتریایی[1] به آن افزوده شد. به منظور کنترل نتایج آزمون نیز از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین با غلظت ۱۰۰mg/ml به عنوان کنترل مثبت (آنتی‌بیوتیکی که حداقل روی یکی از پاتوژن‌ها اثر مهار رشد داشته باشد و هاله مهاری را نشان دهد، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد) و محیط کشت القایی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۶ و از آزمون F برای آنالیز واریانس استفاده شد (Nisbet et al., 2009).

۳. نتایج و بحث

تعداد زیادی ترکیبات فعال زیستی تولید شده توسط ریزاندامگان[2] خشکی وجود دارند (EL-Masry et al., 2002; Woo et al., 2002). با وجود آن، تلاش‌های فراوانی برای رسیدن به ریزاندامگان دریایی به عنوان منابعی با پتانسیل تولیدترکیبات فعال زیستی در حال انجام است (Lodeiros et al., 2001; Slattery et al., 2001; Liu et al., 2002). جداسازی اکتینومیست‌های نادر و ناشناخته به یکی از بخش‌های مهم در یافتن ترکیبات فعال زیستی تبدیل شده است (Lazzarini et al., 2000; Hayakawa et al., 2004).در این تحقیق ایزوله نوکاردیوپسیسبا ویژگی‌های ظاهری، تک کلونی سفید گچی، میسلیوم زمینی سفید رنگ، میسلیوم هوایی سفید، رو و پشت کلونی‌های سفید رنگ از رسوبات ساحل دیلم جداسازی شدند (شکل ۱).

شکل ۱: ریخت‌شناسی نوکاردیوپسیس AHA2 (کلیه ویژگی‌های ظاهری در تصویر قابل تشخیص نیستند. ظاهر سفید گچی که یکی از شاخصه‌های اکتینومیست است که در تصویر می‌توان مشاهده نمود).

آنالیزهای بیوشیمیایی همان‌گونه که در جدول ۴ آمده است، نشان می‌دهند ایزوله AHA2 گرم و کاتالاز مثبت است و نتایج سایر آنالیزهای بیوشیمیایی منفی بود. پس از استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rRNA (شکل ۲) توالی‌یابی ژن مورد نظر صورت گرفت. نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rRNA و آنالیز درخت فیلوژنی نشان

[1] Supernatant

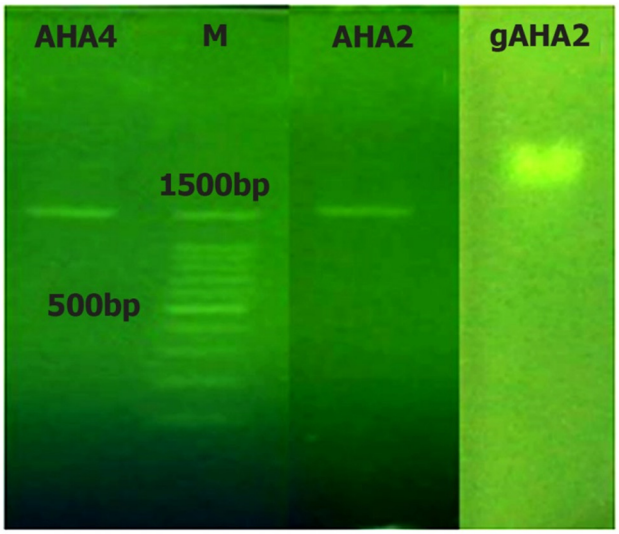
[2] Microorganism

داد که ایزوله مورد مطالعه AHA2 به عنوان جنس *Nocardiopsis* شناخته شد (شکل ۳). نتایج حاصل از بلاست توالی ژن 16S rRNA نشان داد که ۹۸ درصد با *Nocardiopsis dassonvillei* strain HNS048 شباهت دارد و با سایر ایزوله‌ها مانند *Nocardiopsis dassonvillei* strain HBUM 174177 و *Nocardiopsis dassonvillei* strain HBUM174832، ۹۷ درصد شباهت دارد.

جدول ۴: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی اکتینومیست‌های جدا شده

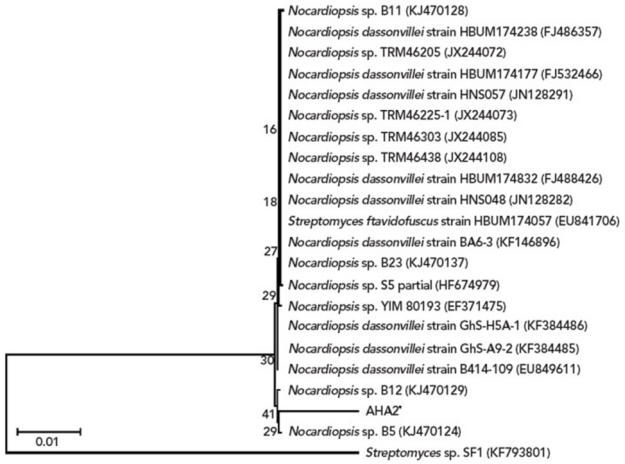
ایندول	وی پی	لیزین دکربوکسیلاز	اورنیتین دکربوکسیلاز	سیمون سیترات	تی اس آی	ام آر	کاتالاز	رنگ آمیزی گرم	مشخصات
-	-	-	-	-	-	-	+	+	نتایج

ایزوله مورد مطالعه AHA2 با گونه‌های *Nocardiopsis* sp. B5(KJ470124) و *Nocardiopsis* sp. B12(KJ470129) در یک کلاد قرار گرفتند، که با بوت استرپ[1] بالای ۴۰٪ تایید شدند. این نتیجه می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که ایزوله AHA2 جداسازی شده از ساحل دیلم یک گونه جدید است. همچنین طول شاخه AHA2 نسبت به گونه *Nocardiopsis* sp. B5(KJ470124) بیش‌تر بود و این نشان‌دهنده واگرایی بیش‌تر این گونه نسبت به گونه *Nocardiopsis* sp. B5(KJ470124) است.



شکل ۲: ژل الکتروفورز: gAHA2 نشان‌دهنده باند حاصل از استخراج DNA ژنومی از ایزوله AHA2، AHA2 محصول PCR ژن 16S rRNA (در محدوده ۱۵۰۰ جفت بازی)است. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA

نتایج حاصل از آزمایش‌های فعالیت ضدباکتریایی نشان می‌دهند که ایزوله AHA2 تنها نسبت به دو باکتری از باکتری‌های مورد مطالعه، فعالیت مهار رشد داشته است. هاله مهاری تشکیل شده در باکتری *Salmonella* sp. (۸/۸۶ میلی‌متر) در مقایسه با باکتری *B. cereus* (۷/۹ میلی‌متر) بیشتر می‌باشد. نتایج حاصل از فعالیت ضدقارچی نیز نشان می‌دهد که ایزوله مورد مطالعه بیشترین اثرمهاری را در مقابل قارچ *A. flavus* (۱۴/۴میلی‌متر) داشته و در مقابل قارچ *Penicillium* sp. هاله‌ای به قطر ۱۳/۳ میلی‌متر تشکیل داده است و در مقابل سایر قارچ‌های مورد مطالعه اثر مهاری نداشته است (جدول ۵).



شکل ۳: درخت فیلوژنی به روش پیوند همجواری[2] گونه AHA2 بر اساس توالی ژن 16S rDNA، *Streptomyces* sp. SF(KF793801) به عنوان برون گروه انتخاب شده است.

جدول ۵: فعالیت ضدمیکروبی عصاره ایزوله AHA2 علیه قارچ‌ها و باکتری‌ها به صورت هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر (اندازه هاله مهار رشد بر اساس میانگین سه تکرار ± انحراف معیار محاسبه شده است. حروف a و b نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح P کمتر یا مساوی ۵٪ بین میانگین‌ها هستند.)

هاله مهاری (میلی‌متر)	قارچ‌های بیماری‌زا	هاله مهاری (میلی‌متر)	باکتری‌های بیماری‌زا
۱۴/۹±۰/۴[a]	*A. flavus*	-	*Proteus* sp.
-	*A. niger*	۷/۹±۰/۵[b]	*B. cereus*
-	*T. mentagrophytes*	-	*Klebsiella* sp.
-	*M. gypseum*	-	*E. coli*
-	*C. albicans*	۸/۸۶±۰/۴[a]	*Salmonella* sp.
۱۳/۳±۰/۷[b]	*Penicillium* sp.		-

[1] Bootstrap

[2] Neighbor Joining

نتایج حاصل از فعالیت ضدمیکروبی نشان می‌دهند که ایزوله مورد نظرفعالیت ضدقارچی بالاتری نسبت به فعالیت ضدباکتریایی دارد. همچنین بیشترین هاله مهاری در مقابل قارچ *A. flavus* با قطر ۱۴/۹ میلی‌متـر تشکیل شده است. همان‌طور که مشـاهده می‌شود در فعالیت ضدمیکروبی ایزوله AHA2 اختلاف معنی‌داری وجود دارد که علت آن می‌تواند به دلیل وجوداختلاف در ماهیت کیتین باشد که چندین فرم در دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد و همین‌طور ماهیت دیواره سلولی باکتری باشد (Matroodi et al., 2013). Govindarajan و همکاران (۲۰۱۴) از محیط کشت القایی برای رهاسازی متابولیت‌های ثانویه *Streptomyces* sp. JRG-04 و از حلال کلروفرم برای عصاره‌گیری و از روتاری برای تغلیظ عصاره و به روش انتشـار دیسک استفاده کردند. نتایج این عصـاره روی *E. coli* (۲۰ mm)، *S. typhi* (۱۸ mm)، *P. volgaris* (۲۰mm) و *K. pneumonia* (۱۷ mm) گزارش شد (Govindarajan et al., 2014). Sirisha و همکاران (۲۰۱۳)، ۶۳ سویه اکتینومیست از رسوبات خلیج بنگال جدا کردند. از بین ۶۳ ایزوله ۱۰ ایزوله از خود فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند. سویه‌های AUBT-206، AUBT-1404 و AUBT-1501 بیش‌ترین فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *E. coli*، *P. vulgaris* و *B. cereus* نشـان دادنـد ولـی سویه‌های AUBT-201، AUBT-702 و AUBT-1703 همانند ایزوله مورد مطالعه در این تحقیق فعالیتی علیه *P. vulgaris* نشان ندادند. بر اساس این مطـالعه اکتینومیست‌های دریایی جدا شده فعالیت ضد باکتریایی بیش‌تری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان دادند (Sirisha et al., 2013). مطالعات بیشتری برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه ایزوله مورد مطالعه لازم است از جمله تخلیص و شناسایی ترکیبـات موثر می‌باشد که به دنبال آن می‌توان حداقل غلظت ممانعت کننده و کشنده را بدست آورد. در مجموع می‌توان گفت ایزوله مورد مطالعه دارای ویژگی‌هایی است که می‌توان به عنوان کنترل زیستی[1] جهت استفاده در کنترل عوامل بیماری‌زا استفاده نمود.

۴. نتیجه‌گیری

باتوجه به فعالیت قابل ملاحظه ایزوله مورد مطالعه علیه باکتری‌های بیماری‌زا،به ویژه علیه باکتری *Salmonella* sp. (با هاله مهاررشد، ۸/۸ میلی‌متر) و همچنین در فعالیت مقابل قارچ‌های بیماری‌زا، به ویژه علیه قارچ *A. flavus* (با هاله مهاررشد، ۱۴/۹ میلی‌متر)، می‌توان از این ایزوله در جهت شناسایی و تخلیص ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی با کاربردهای پزشکی استفاده نمود.

۵. سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهرکه امکان انجـام این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر و قدردانـی به عمل می‌آید.

منابع

Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 6: 71-79.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Hu, W.P.; Munro, M.H.; Northcote, P.T.;Prinsep, M.R., 2007. Marine natural products. Natural Product Reports, 24: 31-86.

Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.; 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 22(1): 7-7.

Bull, A.T.; Stach, J.E.M.; Ward, A.C.; Goodfellow, M., 2005. Marin Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie Van Leeuwenhoek, 87: 65-79.

Doroghazi, J.R.; Metcalf, W.W., 2013. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. BMC Genomics, 14: 611.

EL-Masry, M.H.; Khalil, A.I.; Hassouna, M.S.; Ibrahim, H.A.H., 2002. In situ and in vitro suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on somephytopathogenic fungi. World Journal of Microbiology Biotechnology, 18: 551P.

Fiedler, H.P.; Bruntner, C.; Bull, A.T.; Ward, A.C.;

[1] Biocontrol

Revista de BiologíaTropical, 49: 1213-1222.

Matroodi, S.; Motallebi, M.; Zamani, M.; Moradyar, M., 2013. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(8): 1517-1523.

Monciardini, P.; Sosio, M.; Cavaletti, L.; Chiocchini, C.; Donadio, S., 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16SrDNA from different groups of actinomycetes. FEMSMicrobiology Ecology, 42: 419-429.

Nisbet, R.; Elder, J.; Miner, G., 2009. Handbook of statistical analysis and data mining applications. Elsevier, 391-415PP.

Shrilling, E.B.; Gittlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomycetes* sp. International Journal of Systematic Bacteriology, 16: 313-340.

Sirisha, B.; Haritha, R.; Jaganmohan, Y.S.Y.V.; Sivakumar, K.; Ramana, T., 2013. Bioactive compounds from marine Actinomycetes isolated from the sediments of Bay of Bengal. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 3(2): 257-264.

Sivakumar, K.; Sahu, M.K.; Thangaradjou, T.; Kannan, L., 2007. Research on marine Actinobacteria in India. Indian Journal of Microbiology, 47: 186-196.

Slattery, M.; Rajbhandari, I.; Wesson, K., 2001. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. Microbiology and Ecology, 41(2): 90-96.

Stach, J.E.M.; Maldonado, L.A.; Ward, A.C.; Goodfellow, M.; Bull, A.T., 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. Environmental Microbiology, 5: 828-841.

Takizawa, M.; Colwell, R.R.; Hill, R.T., 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied Environmental Microbiology, 59: 997-1002.

Goodfellow, M.; Potterat, O., Puder, C., Mihm, G.; 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Antonie Van Leeuwenhoek, 87: 37-42.

Govindarajan, G.; Satheeja, V.; jebakumar S.R., 2014. Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycetes, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin. Biologicals, 305-311P.

Hamedi, J.; Imanparast, S.; Mohammadipanah, F., 2015. Molecular, chemical and biological screening of soil actinomycete isolates in seeking bioactive peptide metabolites. Iranian Journal of Microbiology, 7: (1) 23-30.

Hayakawa, M.; Yoshida, Y.; Limura, Y., 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. Journal of Applied Microbiology, 96: 973-981.

Jabari, M.; Matroodi, S.; Zolgharnein, H.; Sharafi, A.; Zamani, I., 2016. Screening, isolation and study of antifungal activity of marine actinomycetes from Deylam nearshore sediments. Iranian Journal of Medical Microbiology, 9 (4): 87-94.

Jensen, P.R.; Gontang, E.; Mafnas, C.; Mincer, T.J.; Fenical, W., 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environmental Microbiology, 7: 1039-1048.

Lazzarini, A.; Cavalette, L.; Toppo, G.; Marinelli, F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie Van Leeuenhock, 78: 399-405.

Liu, Q; Hu, I.; Xue, D.; Ma, C.; Wang, S., 2002. Bioactive substances derived from phytopathogenic fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 551-558PP.

Lodeiros, C.I., Nunez, M., Campos, I., 2001. In vitro evaluation of antibacterial substances produced by bacteria isolated from different marine organisms.

Woo, J.H.; Kitamura, E.; Myouga, H.; Kamei, Y., 2002. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* sp. Applied Environmental Microbiology, 68(6): 2666-75.

Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S., 2013. MEGA6:molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

Tanaka, Y.; Omura, O., 1990. Metabolisms and products of actinomycetes: an introduction. Actinomycetologica, 4: 13-14.