



جداسازی و ارزیابی فعالیت سیتو توکسیک و آنتی اکسیدانی متابولیت‌های زیست‌فعال اکتینوباکتری‌های قابل کشت در رسوبات خلیج فارس

محسن گذری^{۱*}، نیما بهادر^۲، امیر رضا جاسبی^۳، محمد صدیق مرتضوی^۳، ابراهیم افتخار^۰

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پردازی علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس

^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

^۳ مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

^۰ پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی

^{*} مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

نوع مقاله: چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۵/۱۲/۲۳

اصلاح: ۹۶/۰۲/۰۵

پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۸

غربالگری باکتری‌های مولد ترکیبات زیست فعال نخستین گام در برنامه اکتشاف دارو از این منابع

می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر دستیابی به اکتینوباکتری‌های مولد ترکیبات سیتو توکسیک و

آنتی اکسیدان از رسوبات خلیج فارس و ارائه فرایندی برای جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌های دریایی با

به کارگیری ترکیبی از هفت تیمار و شش محیط کشت بود. در کل ۳۹۶ جدایه اکتینوباکتری از ۱۲ نمونه

رسوب جداسازی شد. تیمار حرارت دادن و محیط کشت M^۶ به ترتیب با جداسازی ۳۲/۸۲٪ و ۳۴/۵۹٪

از جدایه‌های اکتینوباکتری بالاترین عملکرد را نشان دادند. نتایج شناسایی اولیه، حضور غالب جدایه‌های

شبیه به *Streptomyces* را در تمام ایستگاه‌های موربد بررسی نشان داد. بررسی الگوی پراکنش جدایه‌های

Streptomyces فراوانی وابسته به عمق آن‌ها را در رسوبات تأیید نمود. الگوی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان

داد ۴۵/۲۷٪ از متابولیت‌های استخراج شده در غلظت ۱۲۵۰ µg/ml قادر به مهار ۹۰٪ رادیکال‌های آزاد

DPPH بودند. میزان IC₅₀ این متابولیت‌ها در محدوده ۴۱۱ µg/ml تا ۶۷۰ متریک میزان متفاوت بود. الگوی فعالیت

سیتو توکسیک نشان داد ۹۰/۵۴٪ از جدایه‌ها دارای LC₅₀ ≥ ۱۰۰۰ µg/ml در مقابله با لارو آرتیما بودند.

میزان LC₅₀ متابولیت‌های تولید شده توسط ۱۲ جدایه برتر در محدوده ۲۳۶/۳ µg/ml تا ۵۶۵/۲ متریک

بود. نتایج به دست آمده حضور گسترده اکتینوباکتری‌های مولد ترکیبات آنتی اکسیدان و سیتو توکسیک در

رسوبات خلیج فارس را تأیید نمود. همچنین جدایه‌های برتر می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی جهت

ادامه مطالعات اکتشاف ترکیبات طبیعی مطرح گردند.

کلمات کلیدی:

اکتینوباکتر

آنٹی اکسیدان

خلیج فارس

سیتو توکسیک

مقدمه

گسترش بیماری‌های انسانی بهویژه سرطان و بیماری‌های عفونی مستلزم اکتشاف داروهای جدید برای مقابله مؤثر با روند افزایشی مقاومت دارویی است (David *et al.*, 2015). افزون بر نیمی از عوامل ضد سرطان تأیید شده، از فراورده‌های طبیعی یا

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Bahador@iaushiraz.ac.ir

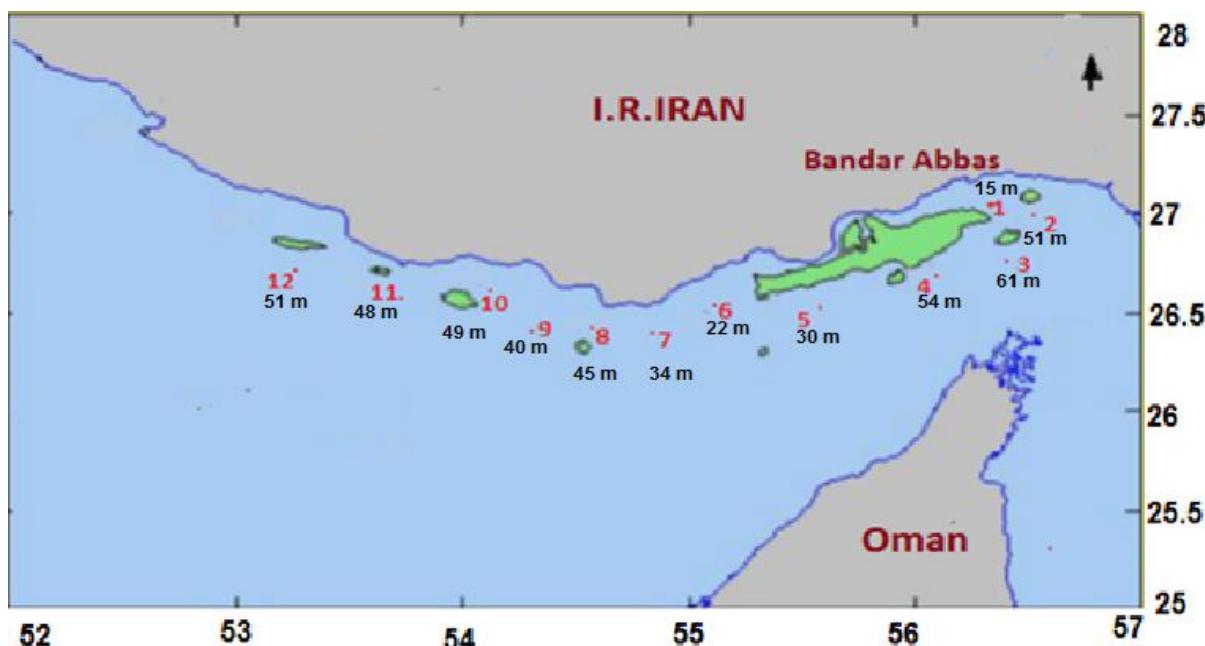
آنالوگ‌های نیمه سینتیک آن‌ها تولید شده‌اند (Kim, 2015). دریاها به عنوان منشأ حیات بیش از ۷۰ درصد سطح زمین و ۸۰ درصد حیات جانوری را در برگرفته‌اند. این سطح بالای تنوع زیستی و شیمیایی، آن‌ها را به عنوان منبعی بسیار غنی از ارگانیسم‌های مولد داروهای ضد سلطان مطرح ساخته است (Montaser and Luesch, 2011). در میان ارگانیسم‌های دریابی، اکتینیوباكتری‌ها به عنوان باکتری‌های گرم مثبت و سaproوفیت دارای بالاترین نسبت ترکیبات زیست‌فعال به کل ترکیبات تولید شده به میزان ۱٪-۴٪ می‌باشند (Hu et al., 2015). از این‌رو به عنوان مهم‌ترین باکتری‌های مطرح در بیوتکنولوژی میکروبی محسوب می‌شوند (Manivasagan et al., 2014). در میان اکتینیوباكتری‌ها، گونه‌های *Streptomyces* به دلیل ظرفیت بیوسترنزی بالا و تولید متابولیت‌های جدید به شدت مورد توجه قرار دارند (Dharmaraj et al., 2009). تاکنون داروهای آنتی تومور بالینی از گروه‌های آتراسایکلین‌ها، پپتیدها، اورئولیک اسیدها، آنیدین‌ها، آنتی متابولیت‌ها (مانند پنتواستاتین)، کارزینوفیلین، میتومایسین از اکتینیوباكتری‌های دریابی کشف شده‌اند (Olano et al., 2009). در یک مطالعه ترکیبات اورولیک اسید شامل کرومومامايسین‌های A2 و B به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های آنتی تومور جدید از اکتینیوباكتری *Streptomyces* sp. WBF16 جداسده از رسوبات دریابی شناسایی شدند. این ترکیبات اثر سیتوتوکسیک قوی علیه رده‌های سلولی سرطان کبد و کلون نشان دادند (Lu et al., 2012). استفاده از روش Brine-Shrimp micowell cytotoxicity کلود شده از رسوبات خلیج فارس (Zhang, 2011). خلیج فارس به دلیل برخورداری از موقعیت ویژه جغرافیایی و شرایط زیست‌محیطی منحصر به فرد به عنوان منبعی برای جداسازی اکتینیوباكتری‌ها انتخاب شد. مطالعات اخیر پتانسیل فعالیت ضد میکروبی اکتینیوباكتری‌های دریابی ساکن در رسوبات خلیج فارس را تأیید نموده است (Gozari et al., 2016a; Gozari et al., 2016b). لیکن فعالیت آنتی‌اسیدانی و سیتوتوکسیک جمعیت‌های اکتینیوباكتری تاکنون تنها در گونه‌های همزیست با خیار دریابی در خلیج فارس بررسی شده است و گزارشی از گونه‌های ساکن در رسوبات وجود ندارد (Gozari et al., 2018). پارامترهای فیزیکو‌شیمیایی خلیج فارس مانند شوری و دمای بالای آب نسبت به دریاهای آزاد و همچنین وجود آلاینده‌های نفتی و پساب‌های صنعتی در این محیط نیمه بسته و کم‌عمق باعث ایجاد استرس‌های مختلف از قبیل استرس اکسیداتیو به ارگانیسم‌ها گردیده و زمینه ساز ایجاد تغییر و سازش در جمعیت ارگانیسم‌های ساکن در رسوبات از جمله اکتینیوباكتری‌ها می‌گردد (Solan and Whiteley, 2016; Riegl and Purkis, 2012). این سازش‌پذیری با عوامل محیطی مستلزم تغییرات ژنتیکی و ایجاد مسیرهای متابولیک جدید در جمعیت‌های باقیمانده می‌باشد. پیامد این تغییرات تولید ترکیبات آنتی‌اسیدان و سیتوتوکسیک جدید می‌باشد (Zotchev et al., 2016). با توجه به تغییرات اقلیمی تنها ۲ درجه افزایش دمای آب دریا می‌تواند باعث در معرض انقراض قرار گرفتن ۱۵-۴۰ درصد گونه‌ها گردد (Stern, 2007). بنابراین جداسازی و نگهداری تنوع زیستی باکتری‌های ارزشمندی چون اکتینیوباكتری‌ها در این اکوسیستم پر خطر از جنبه حفاظت از تنوع زیستی نیز حائز اهمیت می‌باشد. اهداف مطالعه حاضر شامل بررسی تأثیر به کارگیری طیفی از تیمارها و محیط‌های کشت مختلف در افزایش میزان جداسازی و تنوع اکتینیوباكتری‌ها و همچنین ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اسیدانی اکتینیوباكتری‌های جدا شده بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از رسوبات دریابی

نمونه‌برداری از رسوبات خلیج فارس طی یک گشته تحقیقاتی در نیمه اول دی‌ماه ۱۳۹۴ به وسیله کشتی فردوس ۱ در کنار یکی از گشته‌های ارزیابی ذخایر پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان برنامه‌ریزی و اجرا شد. ۱۲ ایستگاه نمونه‌برداری بین عرض‌های جغرافیایی $25^{\circ} 26^{\circ}$ تا $27^{\circ} 10'$ و طول‌های جغرافیایی $53^{\circ} 15'$ تا $56^{\circ} 5'$ تعیین شد. ایستگاه‌های نمونه‌برداری به صورتی انتخاب شدند که تمام منطقه موردمطالعه را در فواصل یکسان پوشش دهند. مختصات جغرافیایی و عمق هر ایستگاه به وسیله دستگاه اکوساندر کشتی ثبت گردید. نمونه‌برداری از رسوبات با استفاده از یک دستگاه نمونه‌بردار رسوبات سطحی (آلمان-Hydro-bios) با سطح مقطع ۱۰ سانتی‌متر مربع انجام شد. در کلیه ایستگاه‌ها پس از اتمام

عملیات نمونه برداری، حدود ۲۰۰ گرم محتویات رسوب داخل نمونه بردار به درون بطری های استریل منتقل و با توجه به نوع تیمار در داخل یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و یا خشک گردیدند (Maldonado *et al.*, 2009).



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری در خلیج فارس. عمق هر ایستگاه در کنار آن مشخص گردیده است.

جداسازی اکتینوバکتری ها

تیمارهای فیزیکی و شیمیابی

به منظور افزایش کارایی جداسازی و حذف باکتری های سریع الرشد تیمارهای فیزیکی و شیمیابی اعمال گردید. تیمارهای فیزیکی شامل تیمار حرارت دادن نمونه های رسوب در 50°C به مدت 50 min (Hames-Kocabas and Atac, 2012)، تیمار خشک کردن در زیر هود لامینار به مدت دو هفته (Jensen *et al.*, 2005a)، تیمار پرتو فرابنفش با طول موج 254 nm در فاصله 20 cm به مدت 30 min (Bredholdt *et al.*, 2007)، تیمار با امواج فرماصوت 40 KHZ به مدت دو دقیقه در دمای 30°C (Qiu *et al.*, 2008)، تیمار فریز کردن نمونه های رسوب در دمای -21°C به مدت 24 ساعت انجام شد (Jensen *et al.*, 2005a). تیمار شیمیابی با افزودن فنول در غلظت نهایی $1/5$ درصد به مدت 30 دقیقه در 30°C صورت گرفت (Bredholt *et al.*, 2008).

تلخیج در محیط های کشت مختلف

۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه های رسوب بعد از تهیه رقت های متوالی در آب دریای استریل روی 6 محیط کشت جداسازی شامل M_1 (نشاسته $1/.$ ٪، کازئین $3/0/.$ ٪، نیترات پتابسیم $\text{KNO}_3/2/.$ ٪، دی پتابسیم هیدروژن فسفات $\text{K}_2\text{HPO}_4/2/.$ ٪، سولفات منیزیم $7/.$ ٪ آبه $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/0/0/0/5/.$ ٪، کربنات کلسیم $\text{CaCO}_3/0/0/0/2/.$ ٪، سولفات آهن $7/.$ ٪ آبه $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/0/0/0/1/.$ ٪، کلرید آگار $1/8/.$ ٪ در آب دریا فیلتر شده)، M_2 (پیتون $5/0/.$ ٪، عصاره مخمر $1/0/.$ ٪، کلرید منیزیم $\text{MgCl}_2/0/8/.$ ٪، کلرید کلسیم $\text{CaCl}_2/0/1/6/.$ ٪، آگار $1/5/.$ ٪ در آب دریا فیلتر شده)، M_3 (عصاره آبی رسوب $1/0/.$ ٪، آگار $1/8/.$ ٪ در آب دریا فیلتر شده)، M_4 (گلوکز $5/0/.$ ٪، آسپاراژین $1/0/.$ ٪، دی پتابسیم هیدروژن فسفات $\text{K}_2\text{HPO}_4/1/0/.$ ٪، آگار $1/8/.$ ٪ در آب دریا فیلتر شده)، M_5

(۱/۸٪ آگار در آب دریا فیلتر شده)، μM (گلیسرول ۵٪، آرژینین ۱٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ۱٪، آگار ۱/۸٪ در آب دریا فیلتر شده) تلقیح گردیدند. محیط‌های تلقیح شده در دمای $28^{\circ}C$ به مدت ۴ هفته از لحاظ رشد کلونی اکتینیوباكتریها مورد بررسی قرار گرفتند (Zhang et al., 2008).

شناسایی اولیه اکتینیوباكتری‌های جدادشده

شناسایی اولیه جدایه‌های به دست آمده پس از خالص‌سازی بر اساس ویژگی‌های مورفو‌لوزیک شامل خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ، شکل، حالت و اندازه کلونی و همچنین خصوصیات میکروسکوپی مانند شکل و آرایش جدایه در رنگ‌آمیزی گرم صورت پذیرفت (Goodfellow et al., 2012).

تولید و استخراج متابولیت‌های زیست‌فعال

کلونی خالص شده هر جدایه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۲ M مایع تلقیح شد. ارلن‌های تلقیح شده به مدت ۵ روز در دمای $28^{\circ}C$ با دور ۲۲۰ rpm گرمایش گردید. پس از اتمام دوره گرمایشی محیط کشت فیلتر شده و با حلal اتیل استات استخراج شد. حلal موجود در مواد استخراج شده با استفاده از دستگاه تبخیر کننده چرخان تحت خلا^۱ و در دمای $37^{\circ}C$ تبخیر گردید (Seidel, 2005).

ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های زیست‌فعال استخراج شده از جدایه‌های متمایز اکتینیوباكتری در غلظت نهایی $\mu g/ml$ ۱۲۵۰ با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت مایکرودایلوشن^۲ مورد غربالگری قرار گرفت. جدایه‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۹۰ درصد به منظور تعیین IC_{50} در غلظت‌های نهایی $\mu g/ml$ ۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۳۹، ۱۹، ۷۸ همچنین از عصاره اتیل استاتی محیط کشت ۲ M مایع به عنوان استاندارد و مтанول به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از عصاره اتیل استاتی محیط کشت ۲ M مایع به عنوان شاهد استفاده گردید. مقدار $5 \mu l$ از غلظت اولیه هر متابولیت یا نمونه‌های کنترل به $195 \mu M$ محلول DPPH در هر چاهک افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، جذب نمونه‌ها در $517 nm$ با استفاده از دستگاه Microplate reader (BioTech instrument) سنجش شد. درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Leong and Shui, 2002).

$$DPPH = \frac{(I_0 - I_{sample})}{I_0} \times 100$$

$$I_0: \text{جذب در چاهک حاوی } 195 \mu l DPPH + 5 \mu l \text{ مtanول}$$

$$I_{sample}: \text{جذب در چاهک نمونه یا کنترل}$$

ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از جدایه‌های متمایز اکتینیوباكتری با استفاده از روش Brine-Shrimp microwell cytotoxicity method مورد غربالگری قرار گرفت (Atta-ur-Rahman, 2001). جهت کشت سلول‌های *Artemia franciscana* حدود یک گرم از سیست آرتمنیا تهیه شده از شرکت INVE بلژیک در یک ارلن حاوی دو لیتر آب دریا فیلتر شده با شوری ppt ۳۰ تلقیح شد. انکوباسیون در محدوده $22-29^{\circ}C$ در معرض نور سفید به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از جمع‌آوری سلول‌های ناپلی، سوسپانسیونی با تراکم $100-150$ ناپلی در میلی‌لیتر تهیه شد. به دنبال آن $10 \mu l$ از سوسپانسیون مذکور به $100 \mu l$ محلول عصاره با غلظت نهایی $1000 \mu g/ml$ در هر چاهک افزوده شد. پس از گرمایشی در

¹ Rotary evaporator

² Microdilution

25°C به مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده ثبت گردید. از مтанول به عنوان کنترل مشتبه استفاده شد. به منظور تعیین LC_{50} جدایه‌های دارای بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک، رقیق‌سازی در غلظت‌های پایین‌تر شامل $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $12.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $6.25\text{ }\mu\text{g/ml}$ انجام شد.

$$\text{درصد فعالیت سیتوتوکسیک} = \frac{(\text{N}_{\text{control}}) - (\text{N}_{\text{test}})}{(\text{N}_{\text{control}})} \times 100$$

N_{test} : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار شده

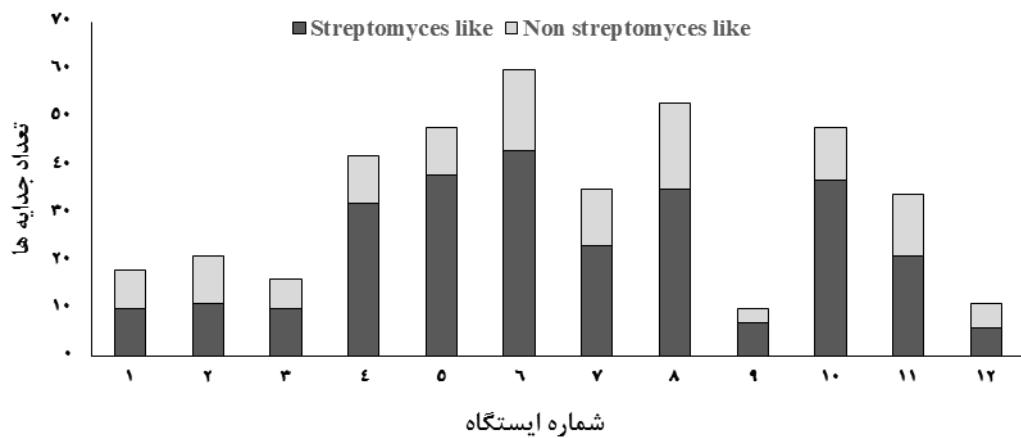
$\text{N}_{\text{control}}$: تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشد

آنالیز آماری

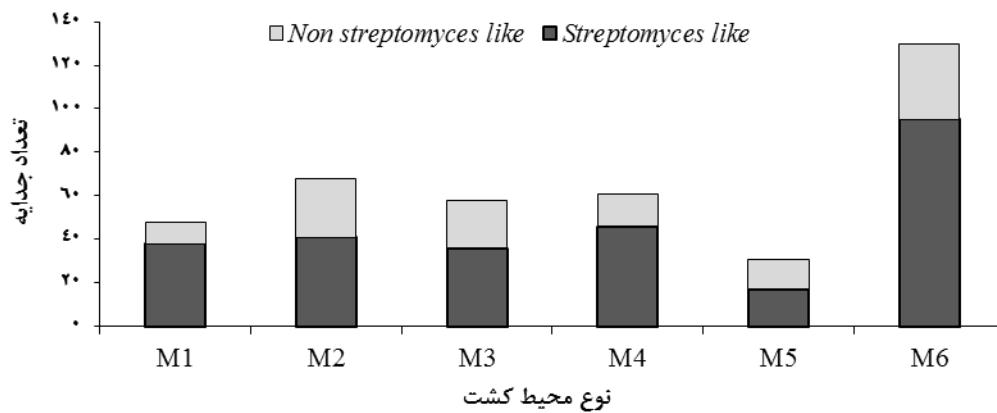
تمام آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های جدازی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft TM Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA) محاسبه گردید. نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدان به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (GraphPad Software, Graphpad prism 6 Inc.) را ارائه شد. IC_{50} و LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵٪ به وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad Software, Graphpad prism 6 Inc.) محاسبه شد.

نتایج

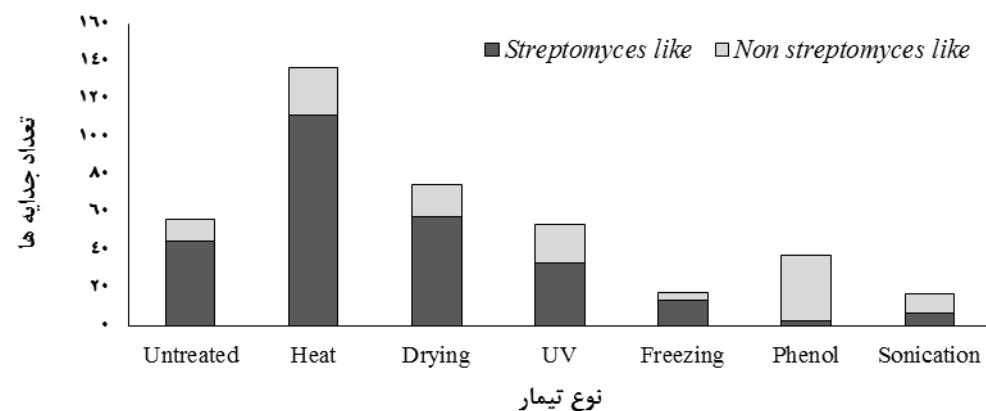
در کل حدود ۳۹۶ جدایه اکتینوباکتری از ۱۲ نمونه رسوب با اعمال ۷ تیمار فیزیکی و شیمیایی و کشت روی ۶ محیط کشت متنوع جدازی شد. بررسی پراکنش اکتینوباکتری‌های قابل کشت در نمونه‌های جمع‌آوری شده نشان داد ایستگاه‌های ۶، ۸ و ۱۰ به ترتیب با جدازی ۴۸، ۵۳ و ۴۸ جدایه بیشترین فراوانی اکتینوباکتری‌ها را شامل گردیدند (شکل ۲). شناسایی اولیه جدایه‌های به دست‌آمده بیانگر حضور غالب جدایه‌های شبیه استرپتومایسین در تمام ایستگاه‌های مورد بررسی بود. مقایسه عملکرد محیط‌های کشت مختلف نشان داد محیط کشت M_6 با جدازی ۱۳٪ جدایه بالاترین کارایی را در بازیابی جدایه‌های اکتینوباکتری ارائه نمود. جدایه‌های شبیه استرپتومایسین در تمام محیط‌های کشت، اکثربیت را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). از ۷ تیمار مختلف فیزیکی و شیمیایی اعمال شده بر نمونه‌های رسوب، تیمار حرارت دادن بیشترین تأثیر را در کاهش تعداد جدایه‌های غیرهدف و سریع الرشد و افزایش رشد اکتینوباکتری‌ها نشان داد. تیمار حرارت دادن با جدازی ۳۴/۵۹ درصد از جدایه‌های اکتینوباکتری در محیط‌های جدازی مختلف، بیشترین کارایی را نشان داد. پس از آن تیمار خشک کردن در جدازی ۱۸/۹۳٪ جدایه‌ها نقش ایفا نمود. به دنبال آن تیمارهای پرتو فرابنفش، فنول، انجماد، فراصوت به ترتیب با جدازی ۱۳/۶۳، ۴/۵۴، ۹/۵۹، ۴/۲۹ درصد جدایه‌ها در مراتب بعدی قرار گرفتند. غلبه جدایه‌های شبیه استرپتومایسین در اکثر تیمارها مشهود بود به طوری که حدود ۸۰ درصد جدایه‌های به دست‌آمده از تیمارهای حرارت دادن، انجماد و تیمار خشک کردن به استرپتومایسین‌ها تعلق داشتند. در صورتی که تیمارهای پرتو فرابنفش، امواج فراصلوت و فنول تنوع گونه‌ای بیشتری از جدایه‌های غیر استرپتومایسین جدازی نمودند (شکل ۴). از میان ۳۹۶ جدایه به دست‌آمده، ۵۱٪ جدایه متمایز بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک انتخاب شدند. نتایج غربالگری فعالیت سیتوتوکسیک نشان داد ۱۴ جدایه در غلظت نهایی $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ قادر به مهار بیش از ۹۰٪ رادیکال‌های آزاد DPPH بودند. تعیین میزان LC_{50} جدایه‌های مذکور نشان داد متابولیت‌های تولید شده توسط جدایه‌های برتر در محدوده غلظت ۶۷۰ تا ۴۱۱ $\mu\text{g/ml}$ قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بودند (جدول ۱). آزمون‌های غربالگری فعالیت سیتوتوکسیک جدایه‌های متمایز نشان داد ۲۸ جدایه در غلظت $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ بیش از ۵۰ درصد سلول‌های آرتمیا را از بین برداشتند. در این میان ۱۲ جدایه معادل $23/52\%$ فعالیت سیتوتوکسیک خود را با حذف بیش از ۹۰٪ سلول‌های آرتمیا نشان دادند. تعیین میزان LC_{50} متابولیت‌های تولید شده توسط ۱۲ جدایه با فعالیت سیتوتوکسیک بالای ۹۰٪ بیانگر فعالیت سیتوتوکسیک این ترکیبات در محدوده غلظت ۲۲۶/۳ $\mu\text{g/ml}$ تا ۵۶۵/۲ در مقابل سلول‌های آرتمیا بود (جدول ۲).



شکل ۲. میزان حضور اکتینوباکتری‌های قابل کشت در ایستگاه‌های نمونهبرداری شده از خلیج فارس



شکل ۳. میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها از رسوبات نمونهبرداری شده از خلیج فارس در محیط‌های کشت مختلف



شکل ۴. تأثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی بر میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها از رسوبات نمونهبرداری شده از خلیج فارس

جدول ۱. میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط متabolیت‌های زیست‌فعال استخراج شده از جدایه‌های منتخب

جدایه	SE ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\pm\text{IC}_{50}$	سطوح اطمینان٪ ۹۵	جدایه	SE ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\pm\text{IC}_{50}$	سطوح اطمینان٪ ۹۵
۰۰ ۱ PG*	۱۷/۱۷ ۴۱۱/۹±	۳۷۶/۰-۴۴۷/۹	۱۳۲ PG	۲۸/۷۹ ۵۷۵/۱±	۵۱۴/۸-۶۳۵/۴
۰۰ ۲ PG	۲۷/۵۷ ۴۱۸/۸±	۳۶۰/۹-۴۷۶/۳	۱۹۱ PG	۴۱۳/۹±۱۹/۰ ۳	۳۷۴/۰-۴۵۳/۷
۰ ۲۵ PG	۳۶/۲۹ ۴۹۷/۴±	۴۳۵/۹-۵۵۸/۸	۲۱۳ PG	۵۸۳/۸±۲۵/۰ ۱	۵۳۱/۵-۶۳۶/۲
۰ ۳۴ PG	۴۳/۴۲۹/۴±۱۸	۳۹۰/۹-۴۶۸/۰	۲۴۳ PG	۴۱۴/۸±۱۵/۵۶	۳۸۲/۱-۴۴۷/۶
۰ ۳۶ PG	۵۴۶/۷±۲۷/۲۴	۴۸۹/۷-۶۰ ۳/۷	۳۴۸ PG	۴۴۷/۸±۱۹/۳۲	۴۰ ۷/۴-۴۸۸/۳
۰ ۵۸ PG	۱۱/۲۶ ۶۷/۰±	۶۱۶/۳-۷۲۵/۶	۳۷۶ PG	۶۱۰/۰±۴۹/۳۱	۵۴۴/۱-۶۷۵/۹
۰ ۷۵ PG	۵۴/۲۵ ۴۲۰/۰±	۳۶۶/۶-۴۷۳/۵	۳۷۷ PG	۴۳۱/۱±۲۳/۵۳	۳۸۱/۸-۴۸۰/۳

* PG: Persian Gulf

جدول ۲. میزان فعالیت سیتو توکسیک متabolیت‌های زیست‌فعال استخراج شده از جدایه‌های منتخب

جدایه	SE ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\pm\text{LC}_{50}$	سطوح اطمینان٪ ۹۵	جدایه	SE ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\pm\text{LC}_{50}$	سطوح اطمینان٪ ۹۵
۰ ۲۶ PG	۴۹۵/۴±۲۰/۳۱	۴۵۰/۲-۵۴۰/۷	۲۲۹ PG	۲۳۶/۳±۸/۷۲	۲۱۶/۹-۲۵۵/۷
۰ ۹۹ PG	۵۶۵/۲±۲۸/۲	۵۰ ۲/۳-۶۲۸/۰	۲۴۳ PG	۳۷۷/۶±۲۱/۵۸	۳۲۹/۵-۴۲۵/۷
۱۳۲ PG	۲۲۹/۶ ± ۲۵/۲۷	۲۷۳/۳-۳۸۵/۹	۲۸۶ PG	۴۳۵/۸±۱۹/۷۳	۳۹۱/۹-۴۷۹/۸
۱۵۵ PG	۲۴۸/۰±۱۷/۶۱	۲۰ ۸/۷-۲۸۷/۲	۳۴۸ PG	۳۵۳/۵±۱۵/۰ ۲	۳۲۰/۰-۳۸۷/۰
۱۹۱ PG	۳۶۶/۸±۲۶/۷۸	۳۰ ۷/۱-۴۲۶/۴	۳۷۶ PG	۴۱۴/۰±۱۲/۲۰	۳۶۹/۲-۴۵۸/۸
۲۱۳ PG	۲۵۴/۴±۱۵/۴۱	۲۲۰/۰-۲۸۸/۷	۳۷۷ PG	۳۴۱/۸±۱۴/۵۴	۳۰ ۹/۴-۳۷۴/۲

بحث

بازیابی بیشترین نوع زیستی در عین برخورداری از تعداد بالای جدایه‌های اکتینوباکتری شانس دستیابی به موفقیت در یافتن سویه‌های مولد ترکیبات زیست‌فعال جدید را افزایش می‌دهد (Zotchev, 2012). به این منظور در مطالعه حاضر از تیمارهای فیزیکی و شیمیایی مختلف و همچنین محیط‌های کشت جدازی با منابع متنوع مغذی جهت جدازی انتخابی و بازیابی بیشترین نوع استفاده شد. نتایج الگوی انتشار اکتینوباکتری‌های قابل کشت در ایستگاه‌های مختلف فراوانی بالاتر جمعیت‌های اکتینوباکتری در ایستگاه‌های ۶، ۸، ۵ و ۱۰ را نشان داد (شکل ۲). فراوانی بالاتر در ایستگاه‌های ۵ و ۶ می‌تواند به دلیل عمق کمتر رسوبات باشد اما در ایستگاه‌های ۸ و ۱۰ علیرغم عمق بیشتر احتمالاً به دلیل نزدیکی به مصب رودخانه‌هایی چون مهران و رودخانه‌های فصلی، فراوانی اکتینوباکتری‌ها افزایش یافت (شکل ۱). بررسی الگوی پراکنش جدایه‌های استرپتومایسین نیز فراوانی وابسته به عمق آن‌ها را در رسوبات نشان داد (شکل ۲). این الگوی پراکندگی می‌تواند پیامد روند ورود بسیاری از گونه‌های استرپتومایسین خاکری به‌وسیله جریان‌های ساحلی به دریا باشد. حضور غالب جمعیت‌های استرپتومایسین در رسوبات کم عمق در سایر مطالعات نیز گزارش شده است. در همین زمینه Jensen و همکارانش گزارش دادند با کاهش عمق رسوبات دریابی فراوانی گونه‌های استرپتومایسین افزایش می‌یابد (Jensen et al., 1991). نتایج مطالعات Vijayakumar و همکارانش نیز بیانگر فراوانی غالب جمعیت‌های استرپتومایسین در رسوبات کم عمق بود (Vijayakumar et al., 2007). در مطالعه دیگری فراوانی وابسته به عمق گونه‌های استرپتومایسین در خلیج تروندهیم در نروژ به اثبات رسید (Bredholdt et al., 2007). همچنین مطالعات قبلی نیز وجود این الگو را در سرتاسر بخش شمالی خلیج فارس نشان داده است (Gozari, 2009a; Gozari, 2009b; Gozari et al., 2016a). نتایج کارایی محیط‌های کشت در جدازی اکتینوباکتری‌ها نشان داد محیط کشت M_{E} با جدازی ۳۲/۸۲٪ جدایه‌ها بالاترین عملکرد را ارائه نمود (شکل ۳). با توجه به حضور گلیسرول به عنوان تنها منبع کربن در ترکیب این محیط کشت و همچنین وفور آن در رسوبات دریابی، جمعیت‌های اکتینوباکتری ساکن در رسوبات مسیرهای متabolیک تجزیه آن را طی تکامل در خود ایجاد و یا توسعه داده‌اند. بنابراین گلیسرول موجود در محیط

کشت μ M به سهولت توسط اکتینوباکتری‌ها مصرف گردید (Liu *et al.*, 2011). آرژینین به عنوان تنها منبع نیتروژن موجود در این محیط کشت به صورت انتخابی رشد اکتینوباکتری‌ها را تحریک نمود. عموماً اکتینوباکتری‌ها دارای مسیرهای بیوشیمیایی کاتabolیسم آرژینین می‌باشند به خوبی از این منبع نیتروژن استفاده نمودند (Khodadad *et al.*, 2011). جداسازی نسبی بالاتر جدایه‌های غیر استرپتومایسین توسط محیط‌های کشت μ M_۲ و μ M_۳ به میزان به ترتیب ۴۰، ۴۶ و ۳۸ درصد و بازیابی تنوع زیستی بالاتر می‌تواند به دلیل بارآلی پایین محیط‌های کشت و تشابه با شرایط فیزیولوژیک ضعیف محیط دریایی باشد (Mann and Lazier, 2013). در زمینه تأثیر تیمارهای مختلف بر فرایند جداسازی، تیمار حرارتی احتمالاً به دلیل مقاومت دمایی اسپور اکتینوباکتری‌ها بالاترین عملکرد را در حذف میکروارگانیسم‌های قابل کشت غیر هدف ارائه نمود (شکل ۴). در همین زمینه، تیمار خشک کردن با کاهش فعالیت آبی موجود در نمونه زمینه جداسازی اکتینوباکتری‌های سازگار با خشکی را فراهم کرد (Gontang *et al.*, 2007). کارایی تیمارهای حرارت دادن و خشک کردن در جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه رسوب در چندین مطالعه مورد تأکید قرار گرفته است (Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005b). جدایه‌های باقیمانده از تیمار پرتو فرابنفش احتمالاً دارای قابلیت‌های ذاتی چون تولید رنگدانه‌ها و یا پلی ساکاریدهای خارج سلولی مقاوم‌ساز به پرتوها بودند (Moeller *et al.*, 2005) و یا بیان ژن آن‌ها به وسیله پرموتوورهای فعال شونده به وسیله نور آغاز شده است (Ohba *et al.*, 2005). همچنین شاید این جدایه‌ها با تحریک سیستم‌های انتقال‌دهنده جذب مواد مغذی توانایی تکثیر خود را حفظ نمودند (Hughes *et al.*, 2005). سایر مطالعات نیز برتری تیمار پرتو فرابنفش در افزایش بازیابی جدایه‌های غیراسترپتومایسین به ویژه نوکاردیا، نوکاردیوپسیس و سودونوکاردیا گزارش نمودند (Bredholt *et al.*, 2008). امواج فراصوت علاوه بر تخریب بسیاری از باکتری‌های سریع الرشد تکسلولی توانایی حذف میسلیوم‌های استرپتومایسین را نیز دارد به همین دلیل، فراوانی استرپتومایسین در نمونه‌های تیمارشده کاهش چشمگیری نشان داد (Jiang *et al.*, 2010). تیمار با فنول کاهش چشمگیری در فراوانی استرپتومایسین‌ها ایجاد نمود. این کاهش می‌تواند به دلیل حساسیت استرپتومایسین‌ها مانند اغلب باکتری‌ها به فنول به علت واکنش با پروتئین‌های حاوی پلیمرهای پلی آمیدی باشد (Istianto *et al.*, 2012). اگرچه اکتینوباکتری‌های غیراسترپتومایسین به دلیل دیواره سلولی غنی از لیپید حساسیت کمتری نشان دادند. تأثیر انتخابی تیمار فنول در حذف استرپتومایسین‌ها به نفع گونه‌های میکرومونوسپورا در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Qiu *et al.*, 2008).

الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیانگر فعالیت حدود ۴۵/۲۷٪. جدایه‌های مورد آزمون در مهران ۹۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH بود. حضور آلوگی‌های نفتی مانند هیدروکربن‌های پلی آروماتیک (PAHs)، فلزات سنگین و زنوبیوتیک‌ها در افزایش فشار اکسیداتیو در رسوبات دریایی و به دنبال آن تحریک تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اکتینوباکتری Nocardiopsis sp. جداشده از رسوبات خلیج Mannar را برابر با $LC_{\mu M}$ به میزان $411/9 \mu g/ml$ با $PG_{\mu M}$ به میزان $1/1000$ باشد (Solan and Whiteley, 2016). در این زمینه Poongodi و همکارانش میزان $IC_{\mu M}$ فعالیت آنتی‌اکسیدانی اکتینوباکتری Nocardiopsis sp. جداشده از رسوبات خلیج Streptomyces malaysiense strain MUSC 136 به میزان $58/2 \mu g/ml$ گزارش نمودند (Poongodi *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری عصاره مтанولی اکتینوباکتری CAS 72 جداشده از رسوبات خلیج Streptomyces sp. به میزان $27/24 \mu g/ml$ آزاد DPPH را مهار نمود (Ser *et al.*, 2016). الگوی فعالیت سیتو توکسیک نشان داد $54/9$ درصد از جدایه‌های مورد آزمون دارای $LC_{\mu M}$ برابر یا کمتر از $1000 \mu g/ml$ بودند. با توجه به معیار پذیرفته شده در اثبات فعالیت زیستی ترکیبات طبیعی با فعالیت کشنده‌گی $\leq 1000 \mu M$ می‌توان فعالیت سیتو توکسیک متابولیت‌های زیست‌فعال استخراج شده را تأیید نمود (Meyer *et al.*, 1982). جدایه $PG_{\mu M}$ به میزان $229/2 \mu g/ml$ با $LC_{\mu M}$ به میزان $236/3 \mu g/ml$ بالاترین فعالیت سیتو توکسیک را نشان داد (جدول ۲). در یک مطالعه Palaniappan و همکارانش میزان $LC_{\mu M}$ متابولیت‌های تولید شده علیه Artemia توسط سویه CAS 72 جداشده از رسوبات دریایی را $22/5 \mu g/ml$ گزارش نمودند (Palaniappan *et al.*, 2013). در مطالعه دیگری $LC_{\mu M}$ متابولیت‌های تولید شده توسط سویه Streptomyces sp. LK-3 جداشده از رسوبات دریایی در مقابل Artemia $31/17 \mu g/ml$ گزارش شد (Karthik *et al.*, 2013). نتایج مطالعات Kesavan و همکارانش نشان داد از میان ۵۲ جدایه به دست‌آمده از رسوبات دریایی ۷ جدایه دارای فعالیت سیتو توکسیک در مقابل Artemia با $LC_{\mu M}$ کمتر از $1000 \mu g/ml$ بودند (Kesavan, 2015).

اکتینوباکتری‌های دریایی مولد ترکیبات آنتی‌اکسیدان و سیتو توکسیک باشند. همچنین جدایه‌های به دست آمده در این مطالعه گزینه‌های نویدبخشی جهت ادامه مطالعات در زمینه اکتشاف ترکیبات آنتی‌اکسیدان و سیتو توکسیک با منشأ میکروبی باشند.

منابع

- Atta-ur-Rahman, C.M., Thomsen, W.J. 2001. Bioassay Techniques for Drug Development. Harwood Academic Publishers. Australia. 203 p.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. 9(11): 2756-2764.
- Bredholt, H., Fjærvik, E., Johnsen, G., Zotchev, S.B. 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. *Marine Drugs*. 6(1): 12-24.
- David, B., Wolfender, J.L., Dias, D.A. 2015. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*. 14(2): 299-315.
- Dharmaraj, S., Ashokkumar, B., Dhevendaran, K. 2009. Food-grade pigments from *Streptomyces* sp. isolated from the marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Food Research International*. 42(4): 487-492.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(10): 3272-3282.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W., Whitman, W.B. 2012. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A*. Springer New York.
- Gozari, M. 2009a. Evaluation of antagonistic properties of isolated actinomycetes from the Persian Gulf sediments against fish and shrimp pathogenic *Vibrio* spp. MSc. thesis. Microbiology Department. Islamic Azad University Branch of Qom. 110 p. (in Persian)
- Gozari, M. 2009b. Evaluation of antimicrobial activity of isolated actinomycetes from marine sediments of the Persian Gulf. Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute. 46 p. (in Persian)
- Gozari, M., Mortazavi, M.S., Karim zadeh, R., Ebrahimi, M., Dehghani, R. 2016a. Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 25(1): 81-93. (in Persian)
- Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A., Mortazavi, M., Eftekhar, E. 2018. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine *Streptomyces* sp. isolated from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 17(2): 413-426.
- Gozari, M., Mortazavi, M., Bahador, N., Rabbaniha, M. 2016b. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 15(2): 630-644.
- Hames-Kocabas, E.E., Ataç, U. 2012. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*. 88(3): 342-347.
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S., Yuan, J. 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*. 13(1): 202-221.
- Hughes, S., El Haj, A.J., Dobson, J., Martinac, B. 2005. The influence of static magnetic fields on mechanosensitive ion channel activity in artificial liposomes. *European Biophysics Journal*. 34(5): 461-468.
- Istianto, Y., Koesomowidodo, R.S.A., Watanabe, Y., Pranamuda ,H., Marwoto, B. 2012. Application of phenol pretreatment for the isolation of rare Actinomycetes from Indonesian soil. *Microbiology Indonesia*. 6(1): 42.
- Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(4): 1102-1108.

- 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(7): 1039-1048.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87(1): 43-48.
- Jiang, Y., Cao, Y., Zhao, L., Wang, Q., Jin, R., He, W., Xue, Q. 2010. Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation. *Wei sheng wu xue bao. Acta Microbiologica Sinica*. 50(8): 1094-1097.
- Karthik, L., Kumar, G., Rao, K.V.B. 2013. Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(4): 325-332.
- Kesavan, S.S.S. 2015. Isolation, characterization and screening for anticancer property of sediment derived actinomycetes from South East coast of India. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 6(1): 491 - 498.
- Khodadad, C.L., Zimmerman, A.R., Green, S.J., Uthandi, S., Foster, J.S. 2011. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(2): 385-392.
- Kim, S.K. 2015. *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*. Springer.
- Leong, L., Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 76(1): 69-75.
- Liu, J., Luo, C., Smith, P.A., Chin, J.K., Page, M.G., Paetzl, M., Romesberg, F.E. 2011. Synthesis and characterization of the arylomycin lipoglycopeptide antibiotics and the crystallographic analysis of their complex with signal peptidase. *Journal of the American Chemical Society*. 133(44): 17869-17877.
- Lu, J., Ma, Y., Liang, J., Xing, Y., Xi, T., Lu, Y. 2012. Aureolic acids from a marine-derived *Streptomyces* sp. WBF16. *Microbiological Research*. 167(10): 590-595.
- Maldonado, L.A., Fragozo-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., Quintana, E.T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 95(2): 111-120.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*. 169(4): 262-278.
- Mann, K.H., Lazier, J.R. 2013. Dynamics of marine ecosystems: biological-physical interactions in the oceans. John Wiley & Sons.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D.j., McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp :a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45(05): 31-34.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10): 5005-5011.
- Moeller, R., Horneck, G., Facius, R., Stackebrandt, E. 2005. Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*. 51(2): 231-236.
- Montaser, R., Luesch, H. 2011. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Medicinal Chemistry*. 3(12): 1475-1489.
- Ohba, H., Satoh, K., Yanagisawa, T., Narumi, I. 2005. The radiation responsive promoter of the *Deinococcus radiodurans pprA* gene. *Gene*. 363: 133-141.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*. 26(5): 628-660.
- Palaniappan, S., Panchanathan, M., Packiyaraj ,V., Kannan, S., Shanmugam, S., Subramaniam, P., Viswanathan, M., Shanmugam, V., Balasubramanian, T. 2013. Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *Streptomyces* sp. CAS72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 3(4): 286-293.

- Poongodi, S., Karuppiah, V., Sivakumar, K., Kannan, L. 2014. Antioxidant activity of *Nocardiopsis* sp., a marine actinobacterium, isolated from the Gulf of Mannar Biosphere Reserve, India. National Academy Science Letters. 37(1): 65-70.
- Qiu, D., Ruan, J., Huang, Y. 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. Applied and Environmental Microbiology. 74(17): 5593-5597.
- Riegl, B.M., Purkis, S.J. 2012. Coral reefs of the Gulf: adaptation to climatic extremes in the world's hottest sea. *Coral Reefs of the Gulf*. Springer. pp. 1-4.
- Seidel, V. 2012. Initial and bulk extraction of natural products isolation. In *Natural Products Isolation*. Humana Press. pp. 27-41
- Ser, H.L., Palanisamy, U.D., Yin, W.F., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H. 2016. *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: a novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. *Scientific Reports*. 6, 24247.
- Solan, M., Whiteley, N. 2016. *Stressors in the Marine Environment: Physiological and ecological responses; societal implications*. Oxford University Press.
- Stern, N.H. 2007. *The economics of climate change: the Stern review*. Cambridge University Press.
- Vijayakumar, R., Muthukumar, C., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., Saravanamuthu, R. 2007. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*. 21(2): 59-65.
- Zhang, H. 2011. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*. 18(10): 902-903.
- Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M., Yu, X. 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93(3): 241-248.
- Zotchev, S.B. 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of Biotechnology*. 158(4): 168-175.
- Zotchev, S.B., Sekurova, O.N., Kurtböke, D.İ. 2016. *Metagenomics of Marine Actinomycetes: From Functional Gene Diversity to Biodiscovery*. *Marine OMICS: Principles and Applications*. CRC Press. pp. 165-186.