Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

جداسازی و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی گونه‌های اکتینوباکتری جداشده از دو گونه خیار دریایی (*Holothuria scabra* و *Holothuria leucospilota*) خلیج‌فارس

محسن گذری[1*]
سعید تمدنی جهرمی[2]
سجادپور مظفر[3]
رامین کریم زاده[4]

۱. پژوهشگر پسادکتری، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران
۲. استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران
۳. استادیار پژوهشی، ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج‌فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران
۴. کارشناس پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

***مسئول مکاتبات:**
m_gozari@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۴۰۷۷۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۵
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

جداسازی انتخابی باکتری‌های زیست فعال از ارگانیسم‌های دریایی نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان موفقیت مطالعات غربالگری دارد. هدف اصلی پژوهش حاضر دستیابی به فرایندی برای جداسازی انتخابی جدایه‌های اکتینوباکتری مولد متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک از ۲ گونه خیار دریایی شامل *Holothuria scabra* و *Holothuria leucospilota* بود. نمونه‌برداری از جزیره لارک واقع در خلیج‌فارس با استفاده از غواصی از اعماق ۱۰ تا ۱۵ متر در اسفندماه ۱۳۹۴ انجام شد. برای جداسازی انتخابی از تیمارهای خشک‌کردن، حرارت دادن، پرتو فرابنفش، امواج فراصوت، انجماد و تیمار با فنول استفاده شد. بدین منظور از ۳ محیط کشت مختلف استفاده شد. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های استخراج‌شده با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و فعالیت سیتوتوکسیک با استفاده از آزمون سمیت میگوی آب‌شور به‌صورت مایکرودایلوشن انجام شد. حدود ۵۸/۴۹ درصد از کل جدایه‌های اکتینوباکتری از خیار دریایی *H. leucospilota* جداسازی شدند. محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار و تیمار حرارت دادن با جداسازی به ترتیب ۲۲ و ۲۱ جدایه اکتینوباکتری، بیشترین کارایی را در انتخابی نمودن فرایند جداسازی نشان دادند. ۳۷/۰۳ درصد از عصاره متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های اکتینوباکتری توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را در محدوده IC_{50} از ۱۳۶/۱ تا ۶۴۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. درحالی‌که ۳۳/۳۳ درصد از متابولیت‌های استخراج‌شده اثر سیتوتوکسیک خود را در محدوده LC_{50} ۱۱۸/۱۲ تا ۶۵۳/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های آرتمیا اعمال نمودند. این پژوهش ضمن ارائه یک فرایند جداسازی انتخابی برای اکتینوباکتریها، حضور و پتانسیل بالای این باکتری‌ها را به‌عنوان بخشی از میکروبیوتای فعال مرتبط با دو گونه خیار دریایی نشان داد. جدایه‌های بدست آمده می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای یافتن ترکیبات طبیعی دارویی باشند.

واژگان کلیدی: اکتینوباکتری‌های مرتبط با خیار دریایی، جداسازی انتخابی، متابولیت‌های ثانویه، فعالیت زیستی.

مقدمه

مطالعه میکروبیوم آبزیان دریایی به‌عنوان راهبردی موفق جهت یافتن ترکیبات طبیعی جدید مطرح‌شده است (Brinkmann *et al.*, 2017). اکوسیستم خلیج‌فارس به‌عنوان یک منبع بکر، پتانسیل بالقوه‌ای برای اکتشاف ترکیبات طبیعی دریایی فراهم نموده است. خیارهای دریایی به راسته خارپوستان و رده خیاران دریایی تعلق دارند. زیستگاه اصلی این موجودات دریایی اغلب آب‌های کم‌عمق گرمسیری و جزایر مرجانی می‌باشد

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

(Rawson and Hoagland, 2019). خیارهای دریایی دارای حرکتی خزنده بوده و با استفاده از شاخک‌های حسی خود از پلانکتون‌ها، باکتری‌ها و مواد آلی موجود در رسوبات تغذیه می‌نمایند (Conand, 2018).

در خلیج‌فارس و دریای عمان جنس‌های متنوع خیار دریایی گزارش‌شده است اما جمعیت غالب خیارهای دریایی بومی به هولوتوریاده تعلق دارند (Mashjoor and Yousefzadi, 2019). از اعضای این خانواده می‌توان به گونه‌های *Holothuria leucospilota*، *H. scabra*، *H. arenicola* و *H. parva* اشاره نمود. علیرغم خواص بیولوژیک گسترده این دسته از ارگانیسم‌های دریایی مطالعات اندکی درزمینه‌ی فلور باکتریایی آن‌ها صورت گرفته است. دریکی از این مطالعات حضور باکتری‌هایی از دسته‌های باکتروئیدتس، فیرمیکویتس، پروتئوباکتریها و البته اکتینوباکتری‌ها در سیستم گوارشی گونه *Apostichopus japonicus* تائید گردید (Gao *et al.*, 2014b). فلور باکتریایی و به‌ویژه اکتینوباکتریایی در این میانکنش اکولوژیک با خیار دریایی نقش‌های متنوعی ازجمله مشارکت در دفاع شیمیایی، تسهیل هضم مواد مغذی جذب‌شده و تقویت ایمنی میزبان را ایفا می‌نماید (Amaro *et al.*, 2012; Gozari *et al.*, 2019c). خیارهای دریایی مانند بسیاری از بی‌مهرگان دریایی در مقابل تهدیدات زیستی پیرامون خود مانند شکارچیان، عوامل بیماری‌زا و عوامل فولینگ متابولیت‌هایی با فعالیت‌های زیستی متنوع ازجمله سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدان تولید نموده و بدین ترتیب استراتژی دفاع شیمیایی خود را اعمال می‌نمایند(Helber *et al.*, 2018) .

در این میان نقش میکروبیوم خیار دریایی از اهمیت ویژه برخوردار بوده تا آنجا که منشأ بسیاری از متابولیت‌های ثانویه استخراج‌شده از بی‌مهرگان دریایی را به میکروبیوم آن‌ها منتسب نموده‌اند (Zhao *et al.*, 2020). لیکن همچنان پاسخ قطعی به این سؤال داغ و اساسی مستلزم پژوهش‌های گسترده ازجمله مطالعه میکروبیوم خیارهای از قبیل باکتری‌های مرتبط با آن‌ها می‌باشد.

اولین گام در چنین مطالعاتی طراحی فرایندی برای جداسازی انتخابی باکتری‌های مرتبط با موجود آبزی است. طی فرایندهای جداسازی غیرانتخابی به دلیل فراهم نشدن احتیاجات تغذیه‌ای در محیط‌های کشت معمول اغلب باکتری‌های مرتبط با جانوران آبزی قابل‌کشت نمی‌باشند (Bodor *et al.*, 2020; Kaboré *et al.*, 2019). از اینرو جداسازی آن‌ها مستلزم بهینه‌سازی فرایندهای جداسازی انتخابی با توجه به زیستگاه بومی آن می‌باشد. در گام بعدی فعالیت‌های زیستی آن‌ها ارزیابی می‌گردد. اکتینوباکتری‌ها به‌عنوان مهم‌ترین باکتری‌های با توانمندی بیوسنتزی بالا، در تولید متابولیت های ثانویه زیست فعال به‌خوبی شناخته‌شده‌اند (Manivasagan *et al.*, 2014). در میان آن‌ها گونه‌های مربوط به جنس *Streptomyces* به دلیل فعالیت‌های زیستی بالا و خصوصیات مورفولوژیک نسبتاً متمایز به‌عنوان شاخص در نظر گرفته می‌شوند (Liu *et al.*, 2018). جداسازی انتخابی این باکتری‌های شاخص و ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌تواند چشم‌اندازی از نقش باکتری‌ها در خیار دریایی میزبان تبیین نماید.

مطالعات مختلفی درزمینه‌ی جداسازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتری‌ها در رسوبات خلیج‌فارس (Gozari *et al.*, 2018a; Gozari *et al.*, 2016) و دریای عمان (Gozari *et al.*, 2019a; Gozari *et al.*, 2019c) و همچنین در ارگانیسم‌های چون اسفنج‌ها در خلیج‌فارس انجام‌شده است (Gozari *et al.*, 2019b). لیکن درزمینه‌ی اکتینوباکتری‌های مرتبط با خیار دریایی در خلیج‌فارس مطالعات کمی صورت گرفته است. در یک مطالعه گذری و همکاران یک‌سویه جدید اکتینوباکتری به نام *Streptomyces* sp. strain SC 156 را از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* جداسازی نمودند. عصاره آلی این سویه فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی بالایی در مقابل رده‌های سلولی انسانی نشان داد (Gozari *et al.*, 2018b). ازاین‌رو با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خلیج‌فارس ازجمله دمای آب و شوری نسبتاً بالا همچنین وجود آلاینده‌های آلی و فلزات سنگین که می‌تواند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در ارگانیسم‌های دریایی ازجمله خیارهای دریایی گردد مطالعه باکتری‌های ارزشمندی چون اکتینوباکتری‌ها در این اکوسیستم حساس از جنبه‌های حفظ تنوع زیستی و کاربردهای بیوتکنولوژیک ضروری می‌باشد (Qin *et al.*, 2019; Puttaswamygowda *et al.*, 2019).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

اهداف پژوهش حاضر شامل دستیابی به بیشترین میزان فراوانی و تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های مرتبط با دو گونه خیار دریایی *Holothuria scabra* و *Holothuria leucospilota* با ارائه یک فرایند جداسازی انتخابی بود. دومین هدف این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک اکتینوباکتری‌های مرتبط با خیار دریایی جمع‌آوری‌شده تعیین شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خیارهای دریایی در اسفندماه ۱۳۹۴ از عمق حدود ۱۰–۱۵ متری جزیره لارک در مختصات جغرافیایی با عرض جغرافیایی ”۳۳ ’۲۵ °۲۶ و طول جغرافیایی ”۴۶ ’۳۳ °۵۶ انجام شد. روش نمونه‌گیری به دلیل عدم انتشار یکسان نمونه‌های خیار دریایی بر اساس مدل نمونه‌برداری تصادفی طراحی شد. بیش از ۲۰ نمونه خیار دریایی به‌وسیله غواصی جمع‌آوری‌شده و در بطری‌های استریل قرار داده شدند. نمونه‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه در کنار یخ نگهداری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شامل ویژگی‌های مورفومتریک و مریستیک توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان شناسایی شدند (Smith, 1984).

به‌منظور بررسی تأثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینوباکتری‌ها در راستای انتخابی شدن فرایند جداسازی تیمارهای فیزیکی و شیمیایی انجام شد. تیمارهای فیزیکی از قبیل تیمار حرارت دادن شامل قرار دادن سوسپانسیون بافت روده هموژن شده خیارهای جمع‌آوری‌شده در $50^{\circ}C$ به مدت ۶۰ دقیقه (Hames-Kocabas and Ataç, 2012)، تیمار خشک‌کردن شامل نگهداری بافت روده در زیر هود لامینار به مدت دو هفته (Jensen *et al.*, 2005)، تیمار پرتو فرابنفش با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر در فاصله ۲۰ cm از بافت روده به مدت ۳۰ ثانیه (Bredholdt *et al.*, 2007)، تیمار سوسپانسیون بافت هموژن شده با امواج فراصوت ۴۰KHZ به مدت دو دقیقه در دمای $30^{\circ}C$ (Qiu *et al.*, 2008)، تیمار فریز کردن بافت در دمای $-21^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (Jensen *et al.*, 2005). تیمار شیمیایی با افزودن فنول در غلظت نهایی ۱/۵ درصد به سوسپانسیون همژن شده بافت روده خیار به مدت ۳۰ دقیقه در $30^{\circ}C$ صورت گرفت (Bredholt *et al.*, 2008).

به‌منظور بررسی تأثیرات محیط کشت در جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌ها چهار محیط کشت جداسازی متنوع شامل محیط کشت مارین زوبل آگار (MZA) حاوی پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد، کلرید منیزیم ($MgCl_2$) ۰/۸ درصد، کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۱/۶ درصد، آگار ۱/۵ درصد در آب دریا فیلتر شده; محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) حاوی نشاسته ۱ درصد، کازئین ۰/۰۳ درصد، نیترات پتاسیم (KNO_3) ۰/۲ درصد، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ۰/۲ درصد، سولفات منیزیم ۷ آبه ($MgSO_4.7H_2O$) ۰/۰۰۵ درصد، کربنات کلسیم ($CaCO_3$) ۰/۰۰۲ درصد، سولفات آهن ۷ آبه ($FeSO_4.7H_2O$) ۰/۰۰۱، آگار ۱/۸ درصد در آب دریا فیلتر شده; محیط کشت گلیسرول آرژنین آگار (GAA) (گلیسرول ۰/۵ درصد، آرژنین ۰/۱ درصد، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ۰/۱ درصد، آگار ۱/۸ درصد در آب دریا فیلتر شده) طراحی و ساخته شد. بعد از هموژناسیون و تهیه رقت‌های متوالی از سوسپانسیون بافت روده خیار دریایی در آب دریای استریل، به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر روی محیط‌های تلقیح گردید. محیط‌های تلقیح شده در دمای $28^{\circ}C$ به مدت ۴ هفته ازلحاظ رشد کلونی اکتینوباکتری‌ها موردبررسی قرار گرفتند (Zhang *et al.*, 2008).

شناسایی جدایه‌های به‌دست‌آمده پس از خالص‌سازی تا سطح خانواده و با تفکیک به جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* و متفاوت از *Streptomyces* انجام شد (Bredholt *et al.*, 2008). این تقسیم‌بندی به دلیل اهمیت جنس *Streptomyces* در میان اکتینوباکتری‌ها بود. با توجه به اهداف مطالعه درزمینه‌ی بررسی میزان انتخابی بودن فرایند جداسازی و تفکیک بر اساس شباهت به استرپتومایسس‌ها، سطح دقت شناسایی در سطح خانواده تعیین گردید. برای شناسایی در این سطح و تشخیص شباهت با جنس نسبتاً تیپیک استرپتومایسس استفاده از روش‌های مورفولوژی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کفایت نمود. بدین منظور از روش‌های بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک شامل خصوصیات ماکروسکوپی

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

مانند رنگ، شکل، حالت ،اندازه کلونی، تولید پیگمان، تولید یا عدم تولید میسلیوم‌های هوایی، رویشی و همچنین خصوصیات میکروسکوپی مانند شکل و آرایش اسپوری جدایه در رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد (Goodfellow *et al.*, 2012).

کلونی خالص‌شده هر جدایه در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نشاسته کازئین نیترات مایع تلقیح شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ $^{\circ}C$ با دور ۲۲۰ دور بر دقیقه مایع تخمیری ایجادشده با استفاده از فیلتراسیون از بیومس باکتری جداسازی شد. به‌منظور استخراج از روش استخراج مایع-مایع با حجم مساوی از حلال اتیل استات استفاده شد. فرایند استخراج به‌منظور افزایش کارایی با سه بار تکرار انجام شد. فاز آلی استخراج‌شده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ تبخیر گردید (Seidel, 2005).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های متمایز اکتینوباکتری در غلظت نهایی ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به‌صورت مایکرودایلوشن غربالگری شد. متابولیت‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش از ۹۰ درصد به‌منظور تعیین IC_{50} در غلظت‌های نهایی ۶۲۵، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹، ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر موردسنجش قرار گرفتند. از آسکوربیک اسید به‌عنوان ماده استاندارد و از متانول به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از عصاره اتیل استاتی محیط کشت باکتری به‌عنوان شاهد استفاده گردید. مقدار ۵ میکرو لیتر از هر رقت از عصاره متابولیت یا نمونه‌های کنترل به ۱۹۵ میکرو لیتر محلول DPPH (میکرومولار) در هر چاهک موجود در میکروپلیت افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه Microplate reader (BioTech instrument) اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Leong and Shui, 2002).

رابطه ۱: درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH = $(I_0) - (I_{sample})/I_0 \times ۱۰۰$

I_0: جذب در چاهک حاوی ۱۹۵ µl DPPH + ۵ µl متانول

I_{sample}: جذب در چاهک نمونه یا کنترل

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های متمایز اکتینوباکتری 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 آرتمیا تهیه‌شده از شرکت INVE بلژیک در یک ارلن حاوی دو لیتر آب دریا فیلتر شده با شوری ۳۰ ppt تلقیح شد. انکوباسیون در محدوده ۲۹- ۲۲ $^{\circ}C$ در معرض نور سفید به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از جمع‌آوری سلول‌های ناپلی، سوسپانسیونی با تراکم ۱۵۰-۱۰۰ ناپلی در میلی‌لیتر تهیه شد. به دنبال آن ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مذکور به ۱۰۰ میکرو لیتر محلول عصاره با غلظت نهایی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک افزوده شد. پس از گرما گذاری در ۲۵ $^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده ثبت گردید. از متانول به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به‌منظور تعیین LC_{50} جدایه‌های دارای بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک، رقیق‌سازی در غلظت‌های پایین‌تر شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر انجام شد. درصد فعالیت سیتوتوکسیک با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید

رابطه ۲: درصد فعالیت سیتوتوکسیک = $[(N_{control}) - (N_{test})/ (N_{control})] \times 100$

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

$N_{control}$: تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشد

آزمون‌های صورت گرفته با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده از فرایند جداسازی باکتری‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft ™ Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA) محاسبه شد. داده‌های سنجش فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی به‌صورت میانگین±خطای

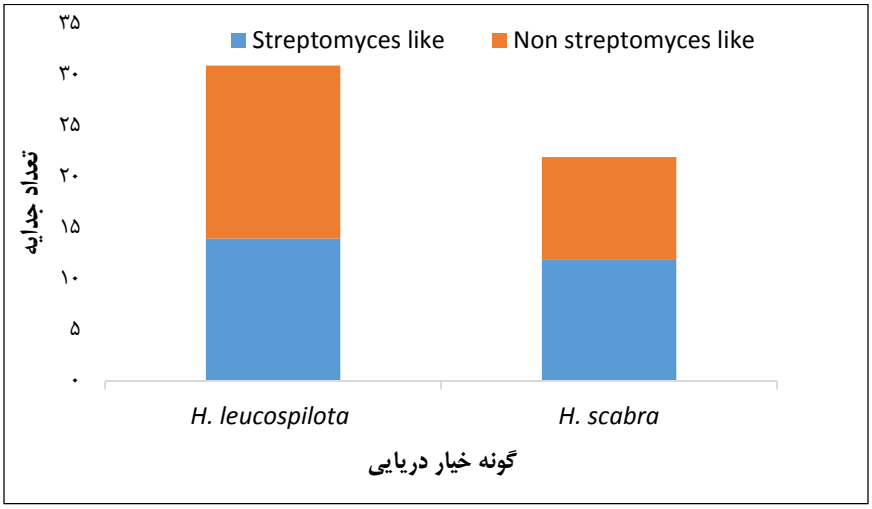
www.SID.ir

استاندارد (SE) ارائه گردید. IC_{50} و LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵ درصد به‌وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad (Graphpad prism 6 Software, Inc.) محاسبه گردید.

نتایج

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک نمونه‌های خیار دریایی بیانگر تعلق آن‌ها به گونه *Holothuria scabra* و *Holothuria leucospilota* بود (شکل ۱). نتایج مطالعه حاضر تأثیر فرایند جداسازی انتخابی را بر فراوانی و تنوع اکتینوباکتری‌های مرتبط با خیار دریایی را تائید نمود. جداسازی از ۲ گونه مختلف خیار دریایی منجر به جداسازی ۵۳ جدایه اکتینوباکتری گردید. نتایج الگوی فراوانی اکتینوباکتری‌ها نشان داد بیشترین میزان جدایه‌های اکتینوباکتری از گونه *H. leucospilota* با ۳۱ جدایه معادل ۵۸/۴۹ درصد و به دنبال آن از گونه *H. scabra* ۲۲ جدایه معادل ۴۱/۵۰ درصد جداسازی گردید. نتایج الگوی تنوع اکتینوباکتریها در نمونه‌های خیار دریایی ازنظر شباهت به جنس *Streptomyces* بیانگر میزان بالاتر حضور جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* در گونه *H. leucospilota* به میزان ۵۴ درصد بود (شکل ۲).

شکل ۱: تصویر خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*.



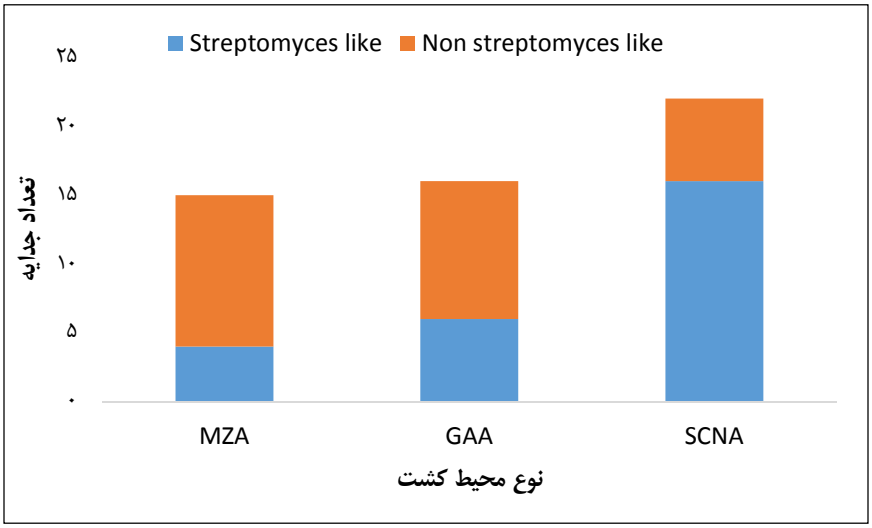
شکل ۲: میزان حضور اکتینوباکتری‌های قابل‌کشت در خیارهای دریایی نمونه‌برداری شده (سال ۱۳۹٤).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

نتایج بررسی فرمولاسیون محیط‌های کشت بر فراوانی اکتینوباکتری‌ها بیانگر بهترین عملکرد محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار (SCNA) با جداسازی ۲۲ جدایه بود. بررسی تأثیر فرمولاسیون محیط‌های کشت بر الگوی تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های جداشده به تفکیک تشابه یا عدم تشابه با استرپتومایسس‌ها نشان داد جدایه‌های شبیه به استرپتومایسس غالب جدایه‌های به‌دست‌آمده (۷۲ درصد) را روی محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار تشکیل دادند. درصورتی‌که بیشتر جدایه‌های رشد نموده روی دو محیط کشت دیگر را جدایه‌های غیر از استرپتومایسس تشکیل دادند (شکل ۳).

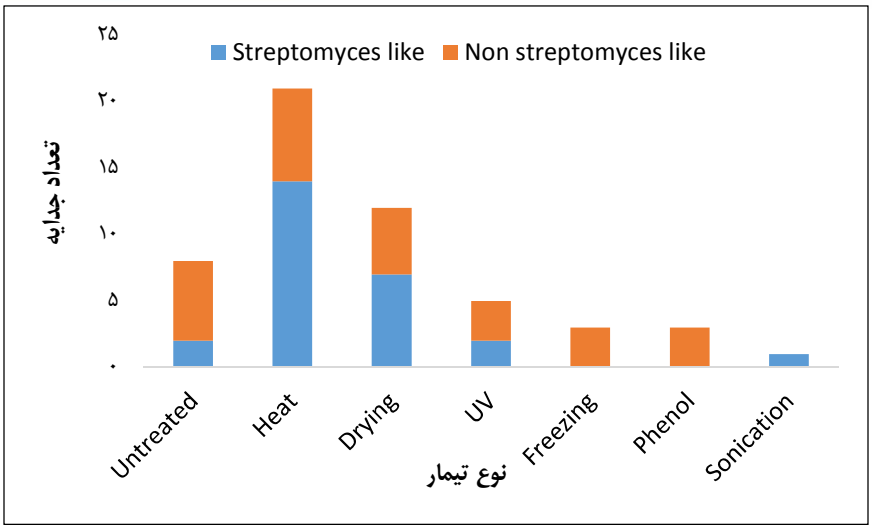


شکل ۳: میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های خیار دریایی در محیط‌های کشت مختلف (سال ۱۳۹٤).

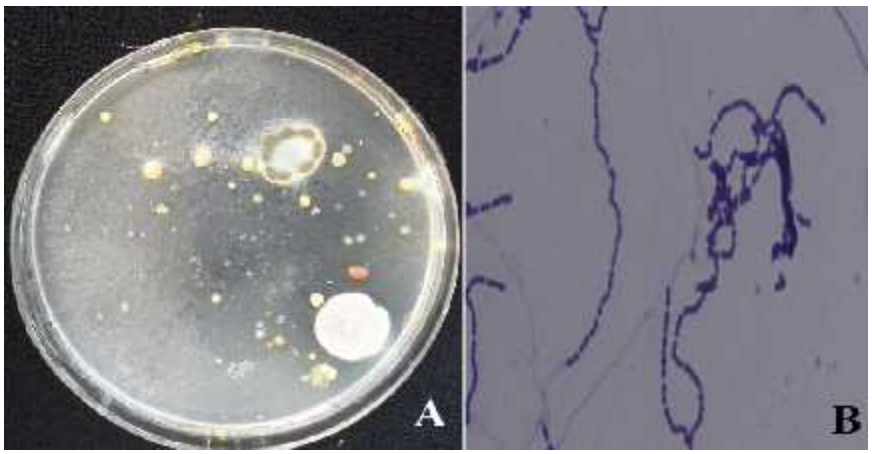
ارزیابی تأثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی در انتخابی نمودن فرایند جداسازی نشان داد تیمارهای حرارت دادن و خشک‌کردن با جداسازی به ترتیب ۲۱ (۳۹/۶۲ درصد) و ۱۲ (۲۲/۶۴ درصد) جدایه اکتینوباکتری عملکرد انتخابی خود را اعمال نمودند و جدایه‌های شبیه به استرپتومایسس در نمونه‌های تیمار شده با این دو تیمار غالب جدایه‌ها را تشکیل دادند (شکل ۴). الگوی تنوع جدایه‌های اکتینوباکتری به‌دست‌آمده به‌وسیله تیمارهای مختلف بیانگر غالبیت جدایه‌های استرپتومایسس در اکثر تیمارهای اعمال‌شده بود. اگرچه تیمار با فنول و منجمد کردن تنها استثناء این روند بود که هیچ جدایه‌ای از استرپتومایسس به‌وسیله آن‌ها جداسازی نشد (شکل‌های ۴ و ۵).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020



شکل ٤: تأثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی بر میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های خیار دریایی (سال ١٣٩٤).



شکل ٥: تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های اکتینوباکتری (سال ١٣٩٤).

A. تصویری از جداسازی اکتینوباکتری‌ها B. تصویر میکروسکوپی جدایه اکتینوباکتری شبیه به استرپتومایسس (بزرگنمایی X ۱۰۰۰).

الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۲۷ جدایه متمایز بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، بیانگر فعالیت بیش از ۹۰ درصدی ۱۰ جدایه معادل ۳۷/۰۳ درصد از جدایه‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود. نتایج نشان داد میزان IC_{50} فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت‌های با فعالیت بیش از ۹۰ درصد از ۱۳۶/۱ تا ۶۴۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود (جدول ۱).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

جدول 1: میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط متابولیت‌های زیست فعال استخراج‌شده از جدایه‌های منتخب (سال ۱۳۹٤)

جدایه	SE (µg/ml)±IC_{50}	جدایه	SE (µg/ml)±IC_{50}
۱۵۶SC*	۲۶/۲۹ ±۰/۲۲۷	۱۸۴SC	۱۱/۴۶ ±۲/۲۵۵
۱۶۷SC	۲۸/۱۸ ±۶/۲۷۱	۱۹۰SC	۳۲۳/۱۷±۱/۰۹
۱۷۰SC	۲۶/۳۳ ±۵/۶۴۱	۱۹۸SC	۲۸۹/۱۱±۲/۰۳
۱۷۵SC	۱۱/۲۷۱/۱۷±۱	۱۹۹SC	۴۸۲/۲۱±۱/۴۵
۱۸۳SC	۱۳۶/۷±۱/۱۴	۲۰۲SC	۲۳۴/۱۹±۱/۹۴
Ascorbic acid	۶/۰±۷۵/۴۴		

SC: Sea Cucumber*

الگوی فعالیت سیتوتوکسیک نشان داد ۹ جدایه معادل ۳۳/۳۳ درصد از جدایه‌های بررسی‌شده بیش از ۹۰ درصد سلول‌های آرتمیا را از بین بردند. میزان LC_{50} فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های با فعالیت بیش از ۹۰ درصد از ۱۱۸/۱۲ تا ۶۵۳/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل آرتمیا متغیر بود (جدول ۲).

جدول ۲. میزان فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های زیست فعال استخراج‌شده از جدایه‌های منتخب (سال ۱۳۹٤).

جدایه	SE (µg/ml)±LC_{50}	جدایه	SE (µg/ml)±LC_{50}
۱۵۶SC	۱۳/۲۱ ±۱۲/۱۱۸	۱۷۵SC	۵۱۳/۲۵±۱۸/۳۱
۱۵۷SC	۰۷/۳۳۱/۱۲±۰۹	۱۸۱SC	۱۲/۵۲ ±۱۵/۶۵۳
۱۶۰SC	۱۸۷/۳۱±۵۱/۴۱	۱۸۴SC	۵۱۲/۲۷±۵۰/۴۵
۱۶۶SC	۱۹۴/۱۸±۵۱/۲۱	۱۹۸SC	۲۳۶/۱۸±۴۴/۱۹
۱۷۰SC	۸۷/۳۳ ±۳۱/۴۸۲		

بحث و نتیجه‌گیری

طراحی و بهینه‌سازی فرایندهای جداسازی انتخابی اکتینوباکتری‌ها موجب دستیابی به بیشترین فراوانی و تنوع و افزایش احتمال یافتن ترکیبات زیست فعال جدید می‌گردد (Buedenbender *et al.*, 2019). نتایج الگوی تنوع اکتینوباکتری‌ها در گونه‌های خیار دریایی موردبررسی بیانگر حضور غالب جدایه‌های شبیه به *Streptomyces* در گونه *H. leucospilota* بود. در سایر مطالعات نیز الگوی تنوع زیستی باکتری‌های ساکن در روده خیار دریایی گزارش‌شده است. برای نمونه در یک مطالعه از ۵۵ گونه باکتری از خیار دریایی *H. leucospilota* جداسازی شده غالب آن‌ها به جنس‌های *Vibrio* و *Bacillus* تعلق داشتند (Zhang *et al.*, 2012). بحث در مورد تفاوت این نتیجه به دلیل اعمال فرایند جداسازی انتخابی در مطالعه حاضر بود. این الگوی تنوع و غالب بودن استرپتومیسس‌ها با توجه به توانمندی‌های فیزیولوژیک نسبتاً برتر آن‌ها از قبیل رشد سریع‌تر نسبت به اکتینوباکتری‌های عمدتاً کند رشد لزوم طراحی فرایندهای جداسازی انتخابی را در راستای کاهش این برتری رقابتی و دستیابی به تنوع زیستی بیشتر را نشان می‌دهد. این الگوی تنوع زیستی می‌تواند تابع عواملی از قبیل میزان تغذیه، ترکیب شیمیایی بافت روده، متابولیسم و فیزیولوژی خیار دریایی و موقعیت جغرافیایی زیستگاه باشد (Weisz *et al.*, 2008). عامل مهم موردبحث دیگر امکان تأثیرپذیری این الگوی

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

تنوع زیستی باکتری‌ها در خیارهای دریایی از الگوی تنوع باکتری‌ها در رسوبات موجود در زیستگاه خیار دریایی می‌باشد. زیرا این رسوبات طی تغذیه وارد دستگاه گوارشی خیار دریایی می‌شوند. تأثیرپذیری الگوی تنوع زیستی روده خیار دریایی از رسوبات پیرامونی در مطالعات مختلف گزارش‌شده است (Gao *et al.*, 2014a; Gao *et al.*, 2014b). مطالعات گذشته حاکی از حضور غالب گونه‌های استرپتومایسس در رسوبات خلیج‌فارس می‌باشد (Gozari *et al.*, 2016).

نتایج این مطالعه نشان داد محیط کشت نشاسته کازئین نیترات آگار بیشترین کارایی را در جداسازی جدایه‌های شبیه به استرپتومایسس‌ها نشان داد. این نتیجه می‌تواند به دلیل وجود مسیرهای کاتابولیسم نشاسته در جدایه‌های استرپتومایسس باشد(Romero-Rodríguez *et al.*, 2017). درحالی‌که در محیط کشت مارین زوبل آگار (MZA) علیرغم جداسازی فراوانی کمتر اکتینوباکتری‌ها میزان تنوع باکتری‌های جداسازی شده و سهم جدایه‌های غیر استرپتومایسس بیشتر بود. بار آلی و میزان منابع مغذی در این محیط کشت نسبت به دو محیط کشت دیگر کمتر بود. این فرمولاسیون شرایطی را شبیه شرایط فیزیولوژیک ضعیف محیط‌های دریایی ایجاد نمود و الگوی جداسازی متنوع‌تری از اکتینوباکتری‌ها را ایجاد گردید (Pérez and Fenical, 2017). تحلیل این نتایج نشان می‌دهد طراحی محیط‌های کشت جداسازی بر اساس نیازمندی غذایی باکتری‌های مرتبط با خیار دریایی موجب ارتقاء قابلیت کشت پذیری و میزان جداسازی باکتری‌ها در این مطالعه شده است.

نتایج تأثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی بر جداسازی اکتینوباکتری‌ها بیانگر کارایی بالاتر تیمار حرارت دادن بود. این نتیجه می‌تواند به دلیل عملکرد انتخابی تیمار حرارت دادن در حذف فرم‌های رویشی حساس به حرارت و تقویت رشد انواع اسپورزا باشد. برخی از اکتینوباکتری‌ها به‌ویژه استرپتومایسس‌ها که در مطالعه حاضر دارای فراوانی نسبتاً بالایی بودند فرم‌های اسپوری تولید نموده که مقاومت نسبی به حرارت دارند. در مطالعات گذشته نیز برتری تیمار حرارت دادن در جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های رسوب گزارش‌شده است (Gozari *et al.*, 2019a; Gozari *et al.*, 2019c). نکته قابل‌توجه عدم جداسازی جدایه‌های شبیه به استرپتومایسس در نمونه‌های تیمار شده با فنول بود. این نتیجه می‌تواند به دلیل واکنش مخرب فنول با پروتئین‌های حاوی پلیمرهای پلی آمیدی در استرپتومایسس‌ها باشد (Istianto *et al.*, 2012; Rangseekaew and Pathom-aree, 2019). این در حالی است که اکتینوباکتری‌های غیراسترپتومایسس با دارا بودن دیواره سلولی غنی از لیپید حساسیت پایین‌تری به فنول نشان دادند. در مطالعه دیگری نیز تیمار با فنول منجر به افزایش جداسازی گونه‌های میکرومونوسپورا نسبت به استرپتومایسس‌ها گردید (Qiu *et al.*, 2008).

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی متابولیت‌های استخراج‌شده بیانگر فعالیت ۳۷/۰۳ جدایه‌های اکتینوباکتری‌ها در مهار بیش از ۹۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH بود. این الگوی ایجادشده بیانگر نقش مهم اکتینوباکتری‌های جداسازی شده در روده خیارهای دریایی میزبان باشد. وجود سطوح بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در بی‌مهرگان دریایی تهدیدی بالقوه برای ارگانیسم محسوب می‌گردد. به همین دلیل خیارهای دریایی ناگزیر به اتخاذ استراتژی‌های دفاعی به‌منظور خنثی‌سازی سطوح بالای ROS با استفاده از تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Velho-Pereira *et al.*, 2015). در مطالعات مختلف نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از متابولیت‌های استخراج‌شده از بی‌مهرگان دریایی گزارش‌شده است. به‌عنوان نمونه در یک مطالعه Motohashi و همکارانش موفق به شناسایی دو پپتید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا به نام‌های JBIR-34 و JBIR-35 از اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج شدند (Motohashi *et al.*, 2010). در این زمینه Poongodi و همکارانش میزان IC_{50} فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت استخراج‌شده از یک اکتینوباکتری به نام *Nocardiopsis* sp. جداشده از رسوبات خلیج Mannar را برابر با ۵۸/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند (Poongodi *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری گذری و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های استخراج‌شده از یک‌سویه جدید اکتینوباکتری به نام *Streptomyces* sp. strain SC 156 را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به میزان ۲۱۱/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند (Gozari *et al.*, 2018b). پیشنهاد شد که این سویه اکتینوباکتری می‌تواند در غذاهای تخمیری و صنایع دارویی قابل‌استفاده باشد.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج‌شده بیانگر کشندگی ۳۳/۳۳ درصد از جدایه‌های اکتینوباکتری در مقابل سلول‌های آرتمیا بود. این نتیجه شاهد دیگری از نقش فعال اکتینوباکتری‌های مرتبط و همزیست با بی‌مهرگان دریایی را در مواجهه با چالش‌های محیطی ارائه نمود. تعیین میزان LC_{50} متابولیت‌های استخراج‌شده بیانگر فعالیت سیتوتوکسیک بالای آن‌ها بود. مطالعات دیگر نیز ترکیبات زیست فعال را از باکتری‌های همزیست خیار دریایی جداسازی نموده‌اند برای نمونه متابولیت‌های استخراج‌شده از اکتینوباکتری Pseudonocardia sp. HS7 جداشده از خیار دریایی گونه *H. moebii* فعالیت سیتوتوکسیک به میزان ۰/۵۹ تا ۳/۳۹ نانومولار را در مقابل سلول‌های سرطانی نشان داد (Ye *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری نیز گذری و همکاران فعالیت سیتوتوکسیک اکتینوباکتری *Streptomyces sp.* strain SC 156 را به میزان ۲۶/۴۸ و ۱۸/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در مقابل دو رده سلولی سرطان کلون شامل HCT 116 و SW 480 گزارش نمودند (Gozari *et al.*, 2018b).

نتایج این پژوهش استراتژی کارآمدی متشکل از ترکیبی از تیمار حرارت دادن و کشت در محیط نشاسته کازئین نیترات آگار را به‌منظور انتخابی نمودن فرایند جداسازی اکتینوباکتری‌ها از روده خیارهای دریایی ارائه نمود. همچنین بر اساس نتایج الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک به‌دست‌آمده حضور اکتینوباکتری‌ها به‌عنوان بخشی فعال از میکروبیوتای مرتبط با دو گونه خیار دریایی در خلیج‌فارس تأیید گردید. ترکیبات آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک تولیدشده توسط جدایه های به‌دست‌آمده می‌توانند در پژوهش‌های آینده مورد شناسایی و مطالعه بیشتر قرار گیرند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان در اجرای این پروژه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Amaro, T., Luna, G. M., Danovaro, R., Billett, D. S. and Cunha, M. R., 2012. High prokaryotic biodiversity associated with gut contents of the holothurian molpadia musculus from the nazaré canyon (ne atlantic). Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 63: 82-90.

Atta-ur-Rahman, C. M. and Thomsen W. J. 2001. Bioassay techniques for drug development. Pp. eds. Harwood Academic Publishers, Australia.

Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Kis, Á. E., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K. and Rákhely, G., 2020. Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology: 1-22.

Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L. P. and 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: 2756-2764.

Bredholt, H., Fjærvik, E., Johnsen, G. and Zotchev, S. B., 2008. Actinomycetes from sediments in the trondheim fjord, norway: Diversity and biological activity. Marine drugs, 6: 12-24.

Brinkmann, C. M., Marker, A. and Kurtböke, D. I., 2017. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. Diversity, 9: 40.

Buedenbender, L., Carroll, A. R. and Kurtböke, D. İ., 2019. Integrated approaches for marine actinomycete biodiscovery. Frontiers in Clinical Drug Research-Anti Infectives: Volume 5, 5: 1.

Conand, C., 2018. Tropical sea cucumber fisheries: Changes during the last decade. Marine Pollution Bulletin, 133: 590-594.

Gao, F., Li, F., Tan, J., Yan, J. and Sun, H., 2014a. Bacterial community composition in the gut content and ambient sediment of sea cucumber apostichopus japonicus revealed by 16s rrna gene pyrosequencing. PLoS ONE, 9.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

Gao, F., Tan, J., Sun, H. and Yan, J., 2014b. Bacterial diversity of gut content in sea cucumber (apostichopus japonicus) and its habitat surface sediment. Journal of Ocean University of China, 13: 303-310.

Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W. and Whitman, W. B., 2012. Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a. Springer New York.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A. R. and Eftekhar, E., 2018a. Isolation and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of bioactive metabolites of cultured actinobacteria in persian gulf marine sediments. Journal of Aquatic Ecology, 7: 57-67.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A. R., Mortazavi, M. and Eftekhar, E., 2018b. 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: 413-426.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A. R., Mortazavi, M. S., Hamzehei, S. and Eftekhar, E., 2019a. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the oman sea sediments. Acta Oceanologica Sinica, 38: 84-90.

Gozari, M., Bahador, N., Mortazavi, M. S., Eftekhar, E. and Jassbi, A. R., 2019b. An "olivomycin a" derivative from a sponge-associated streptomyces sp. Strain sp 85. 3 Biotech, 9: 439.

Gozari, M., Mortazavi, M., Ebrahimi, M. and Dehghani, R., 2016. Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of actinomycetes from marine sediments of persian gulf (hormozgan province). Iranian Scientific Fisheries Journal, 25: 81-94.

Gozari, M., Zaheri, A., Jahromi, S. T., Gozari, M. and Karimzadeh, R., 2019c. Screening and characterization of marine actinomycetes from the northern oman sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity. International Microbiology, 22: 521-530.

Hames-Kocabas, E. E. and Ataç, U., 2012. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. Journal of microbiological methods, 88: 342-347.

Helber, S. B., Hoeijmakers, D. J., Muhando, C. A., Rohde, S. and Schupp, P. J., 2018. Sponge chemical defenses are a possible mechanism for increasing sponge abundance on reefs in zanzibar. PLoS ONE, 13: e0197617.

Istianto, Y., Koesomowidodo, R. S. A., Watanabe, Y., Pranamuda, H. and Marwoto, B., 2012. Application of phenol pretreatment for the isolation of rare actinomycetes from indonesian soil. Microbiology Indonesia, 6: 42.

Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. and Fenical, W., 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical pacific ocean sediments. Environmental microbiology, 7: 1039-1048.

Kaboré, O. D., Godreuil, S. and Drancourt, M., 2019. Improved culture of fastidious gemmata spp. Bacteria using marine sponge skeletons. Scientific reports, 9: 1-8.

Leong, L. and Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in singapore markets. Food chemistry, 76: 69-75.

Liu, R., Deng, Z. and Liu, T., 2018. Streptomyces species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. Metabolic engineering, 50: 74-84.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S. K., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiological research, 169: 262-278.

Mashjoor, S. and Yousefzadi, M., 2019. Cytotoxic effects of three persian gulf species of holothurians. Iranian journal of veterinary research, 20: 19.

Motohashi, K., Takagi, M. and Shin-ya, K., 2010. Tetrapeptides possessing a unique skeleton, jbir-34 and jbir-35, isolated from a sponge-derived actinomycete, streptomyces sp. Sp080513ge-23. Journal of Natural Products, 73: 226-228.

Pérez, L. B. and Fenical, W., 2017. Accessing marine microbial diversity for drug discovery. Pp. 169-187 in Microbial resources Elsevier.

Poongodi, S., Karuppiah, V., Sivakumar, K. and 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: 65-70.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 9:52 +0430 on Monday June 22nd 2020

Puttaswamygowda, G. H., Olakkaran, S., Antony, A. and Purayil, A. K., 2019. Present status and future perspectives of marine actinobacterial metabolites. Pp. 307-319 in Recent developments in applied microbiology and biochemistry Elsevier.

Qin, S., Li, W. J., Klenk, H. P., Hozzein, W. N. and Ahmed, I., 2019. Actinobacteria in special and extreme habitats: Diversity, function roles and environmental adaptations. Frontiers in microbiology, 10: 944.

Qiu, D., Ruan, J. and Huang, Y., 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus micromonospora. Applied and environmental microbiology, 74: 5593-5597.

Rangseekaew, P. and Pathom-aree, W., 2019. Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. Frontiers in microbiology, 10.

Rawson, K. and Hoagland, P., 2019. Sea cucumbers in a pickle: The economic geography of the serial exploitation of sea cucumbers. Ecology and Society, 24.

Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Guzmán-Trampe, S., Maldonado-Carmona, N., Vázquez-Hernández, M., Zelarayán, A., Rodríguez-Sanoja, R. and Sánchez, S., 2017. Carbon catabolite regulation in streptomyces: New insights and lessons learned. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33: 162.

Seidel, V., 2005. Initial and bulk extraction. Natural products isolation: 27-46.

Smith, A., 1984. Classification of the echinodermata. Palaeontology, 27: 431-459.

Velho-Pereira, S., Parvatkar, P. and Furtado, I. J., 2015. Evaluation of antioxidant producing potential of halophilic bacterial bionts from marine invertebrates. Indian journal of pharmaceutical sciences, 77: 183.

Weisz, J.B., Lindquist, N., Martens, C. S., 2008. Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? Oecologia, 155: 367-376.

Ye, X., Anjum, K., Song, T., Wang, W., Yu, S., Huang, H., Lian, X.-Y., Zhang, Z., 2016. A new curvularin glycoside and its cytotoxic and antibacterial analogues from marine actinomycete pseudonocardia sp. Hs7. Natural Product Research, 30: 1156-1161.

Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M. and Yu, X., 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van Leeuwenhoek, 93: 241-248.

Zhang, X., Nakahara, T., Miyazaki, M., Nogi, Y., Taniyama, S., Arakawa, O., Inoue, T. and Kudo, T., 2012. Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber holothuria leucospilota. The Journal of General and Applied Microbiology, 58: 447-456.

Zhao, F., Liu, Q., Cao, J., Xu, Y., Pei, Z., Fan, H., Yuan, Y., Shen, X. and Li, C., 2020. A sea cucumber (holothuria leucospilota) polysaccharide improves the gut microbiome to alleviate the symptoms of type 2 diabetes mellitus in goto-kakizaki rats. Food and Chemical Toxicology, 135: 110886.

www.SID.ir