



## Identification and evaluation of antidiabetic activity of bacteria isolated from Persian Gulf sponges

Atefeh Ansarizadeh<sup>1</sup>, Farshid Kafilzadeh<sup>2</sup>, Saeid Tamadoni Jahromi<sup>3</sup>, Mohammad Kargar<sup>4</sup>, Mohsen Gozari<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>2</sup>Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>3</sup>Associate Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran. <sup>4</sup>Professor, Department of Microbiology, Zand Institute of Higher Education Shiraz, Shiraz, Iran. <sup>5</sup>Assistant professor, Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Screening and identification of bacteria associated with sponges is an important step in the discovery of new drugs. The purpose of this research was to isolate and identify bacteria associated with sponges around Hormuz Island and to find bacteria that produce metabolites that inhibit the activity of alpha-glucosidase and alpha-amylase enzymes.

**Materials & Methods:** In this study, 25 samples of *Haliclona* and *Niphatea* sponges were collected from 6 stations. Identification was done based on phenotypic characteristics. Bacteria were cultured in broth nutrient medium and their secondary metabolites were extracted by ethyl acetate. The inhibition rate of metabolites against alpha-amylase and alpha-glucosidase was evaluated based on colorimetric methods. The toxicity of metabolites against normal umbilical cord endothelial cell line was investigated. The productive bacteria were identified by polyphasic taxonomy approach.

**Results:** A total of 105 bacteria were isolated. *Vibrio* and *Bacillus* bacteria with 32.81% and 17.19% in *Haliclona sp.* and 19.51% and 34.15% in *Niphatea sp.* The metabolites extracted from 3 isolates inhibited amylase enzyme activity with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.248 to 366.8 µg/ml. Also, 4 isolates produced inhibitory metabolites against alpha-glucosidase enzyme in IC<sub>50</sub> values from 159.4 to 670.9 µg/ml. Based on the results of polyphasic identification of capable isolates including *Bacillus pumilus* HH 165, *Pseudomonas lurida* HH 124, *Streptomyces sp.* HN 235, *Bacillus tequilensis* HN 231.

**Conclusion:** In this study, 3 strains of bacteria producing inhibitory compounds, including alpha-ambellase and alpha-glucosidase enzymes, and without cytotoxicity were identified. The mentioned bacteria can be suitable candidates in diabetes studies.

**Keywords:** alpha-amylase, alpha-glucosidase, sponge-related bacteria, secondary metabolites, anti-diabetes, Persian Gulf.

Received: 10 June 2023

Revised: 7 October 2023

Accepted: 13 November 2023

Correspondence to: Farshid Kafilzadeh

Tel: +98 9171140799

E-mail: kafilzadeh@jia.ac.ir

Journal of Microbial World 2023, 16 (3): 195 - 206

DOI:10.30495/jmw.2023.1977400.2048



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## شناسایی و ارزیابی فعالیت ضددیابتی باکتری‌های جدا شده از اسفنج‌های خلیج فارس

عاطفه انصاری‌زاده<sup>۱</sup>، فرشید کفیل‌زاده<sup>۲\*</sup>، سعید تمدنی جهرمی<sup>۳</sup>، محمد کارگر<sup>۴</sup>، محسن گذری<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۲</sup> استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۳</sup> دانشیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران. <sup>۴</sup> استاد، گروه میکروبیولوژی، مؤسسه آموزش عالی زند شیراز، شیراز، ایران. <sup>۵</sup> استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** غربالگری باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها گامی مهم در اکتشاف داروهای جدید می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های پیرامون جزیره هرمز و یافتن باکتری‌های مولد متابولیت‌های بازدارنده فعالیت آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ۲۵ نمونه از اسفنج‌های *Niphatea* و *Haliclona* از ۶ ایستگاه جمع‌آوری شدند. شناسایی بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی انجام شد. باکتری‌ها در محیط نوترینت براث کشت و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها بوسیله اتیل استرات استخراج شد. میزان بازدارندگی متابولیت‌ها در مقابل آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز بر اساس روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد. سمیت متابولیت‌ها علیه رده سلولی نرمال اندوتلیال بند ناف بررسی شد. باکتری‌های مولد با رویکرد تاکسونومی پلی‌فازی شناسایی شدند.

**یافته‌ها:** در کل ۱۰۵ باکتری جداسازی گردید. باکتری‌های *ویبریو* و *باسیلوس* با ۳۲/۸۱ و ۱۷/۱۹ درصد در *Haliclona sp.* و ۱۹/۵۱ و ۳۴/۱۵ درصد در *Niphatea sp.* فراوانی غالب را تشکیل دادند. متابولیت‌های استخراج شده از ۳ جدایه با مقادیر IC<sub>50</sub> متغیر از ۲۴۸/۰ تا ۳۶۶/۸ g/ml  $\mu$  فعالیت آنزیم آمیلاز را ممانعت کردند. همچنین ۴ جدایه مولد متابولیت‌های بازدارنده علیه آنزیم آلفا گلوکوزیداز در مقادیر IC<sub>50</sub> از ۱۵۹/۴ تا ۶۷۰/۹ بودند. بر اساس نتایج شناسایی پلی‌فازی جدایه‌های توانمند شامل *Bacillus pumilus* HH 165، *Pseudomonas lurida* HH 124، *Streptomyces sp.* HN 235، *Bacillus tequilensis* HN 231 بودند.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه ۳ سویه باکتری مولد ترکیبات بازدارنده شامل آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز و فاقد سمیت سلولی شناسایی گردید. باکتری‌های مذکور می‌توانند کاندیدای مناسبی در مطالعات بیماری دیابت باشند.

**واژگان کلیدی:** آلفا آمیلاز، آلفا گلوکوزیداز، باکتری‌های مرتبط با اسفنج، متابولیت‌های ثانویه، دیابت، خلیج فارس.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۲۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۰

### مقدمه

ترکیبات طبیعی برخوردار هستند (۱). وجود زیستگاه‌های مختلف با شرایط محیطی متفاوت همچون میزان دسترسی به مواد مغذی، نور، میزان شوری، pH، دما، فشار و اکسیژن زمینه تنوع را در این اکوسیستم بزرگ فراهم کرده است (۲). ترکیبات طبیعی دریایی فرصتی فوق‌العاده را برای دستیابی به

اکوسیستم‌های دریایی به‌عنوان متنوع‌ترین اکوسیستم‌های کره زمین از قابلیت‌های منحصر به فردی برای مطالعات اکتشاف

(\* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.  
پست الکترونیک: kafilzadeh@jia.ac.ir  
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹



آنزیم می‌گردند. اگرچه تاکنون ترکیبات ضددیابتی مختلفی از موجودات دریایی همچون شکم پایان، اسفنج‌ها و حلزون‌ها جداسازی شده است اما گزارش‌های معدودی در خصوص مهارکننده‌های آنزیمی جداسازی شده از باکتری‌های دریایی ارائه شده است (۱۲). این مهارکننده‌ها جذب گلوکز را به تاخیر انداخته و متابولیسم ساکارز به گلوکز را مهار می‌کنند (۱۳). با وجود پیشرفت در طراحی دارو، هنوز هم نیاز مبرم به داروهای جدید با منشاء طبیعی برای مقابله با بیماری‌های مختلف از جمله دیابت وجود دارد (۱۴). هدف اصلی از اجرای مطالعه حاضر دستیابی به فرآورده‌های میکروبی بازدارنده فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز از باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های پیرامون جزیره هرمز بود.

### مواد و روش‌ها

*الف) نمونه‌برداری از اسفنج‌ها:* در اردیبهشت ۹۹ حدود ۲۵ نمونه اسفنج به وسیله غواصی از عمق حدود ۱۰ تا ۱۵ متری آب‌های پیرامون جزیره هرمز جمع‌آوری شده و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک شامل ویژگی‌های مورفومتریک و مورفومریستیک از قبیل شناسایی اسپیکول‌ها، توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان شناسایی گردیدند (۱۵) (شکل ۱).



شکل ۱: نمونه‌های اسفنج جمع‌آوری شده. A. نیفاتس B. هالیکلونا.

*ب) جداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌ها:* اسفنج‌های نمونه‌برداری شده، پس از شستشو با آب دریای استریل و در هاون‌های استریل هموژن شده و در محیط‌های کشت با فرمولاسیون سازگار با شرایط زیست طبیعی آن‌ها کشت شدند. از محیط کشت‌های Glycerol zobell agar Marine

ترکیبات متنوع و منحصر به فرد فراهم نموده و به توسعه صنعت تولید دارو منجر شده است (۳). ارگانایسم‌های مولد ترکیبات طبیعی در تمامی تاکسون‌های حیات یافت می‌شوند. در این میان نقش میکروارگانایسم‌های دریایی به دلیل تولید ترکیبات منحصر به فرد بسیار مورد توجه می‌باشد (۴). استفاده از ترکیبات طبیعی زیست فعال با منشاء میکروبی در صنایع داروسازی در حال گسترش بوده و این ترکیبات در زمینه‌های مختلف از جمله ایمنی درمانی، شیمی درمانی سرطان و اثرات ضدالتهابی کاربردهای وسیعی دارند. ترکیبات ثانویه تولید شده توسط باکتری‌های دریایی، طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی همچون خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی، ضددیابت، کشنده یا متوقف کننده رشد سلول، ضدالتهابی، ضدانگلی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدان و ضدگرزایی را از خود نشان می‌دهند (۹و۵).

اسفنج‌های دریایی به شاخه روزن داران تعلق داشته و با فیلتر کردن حجم قابل توجهی از آب پیرامون خود با استفاده از یک سیستم پیشرفته تغذیه می‌کنند. به این وسیله بسیاری از میکروارگانایسم‌ها، جلبک‌ها و ذرات آلی را جذب و از طریق فاگوسیتوز هضم می‌نمایند (۱۰). باکتری‌ها می‌توانند تا  $10^6$  درصد زیست‌توده اسفنج یعنی معادل  $10^8$  تا  $10^9$  باکتری در هر گرم از بافت اسفنج را تشکیل دهند (۱۱).

دیابت یک اختلال متابولیک در بدن است. در این بیماری، توانایی تولید انسولین در بدن از بین می‌رود و یا بدن در برابر تولید انسولین مقاوم شده و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد (۱۱). مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز، از مهمترین داروهای خوراکی ضد افزایش گلوکز خون می‌باشند (۱۲). آنزیم آلفاگلوکوزیداز نقش مهمی در هضم و جذب قندها دارد. این آنزیم در پرزهای روده کوچک قرار گرفته و با شکستن پیوندهای آلفا یک به چهار گلیکوزیدی در طی مرحله نهایی هیدرولیز، چند قندی‌ها، سه قندی‌ها و دو قندی‌ها را به گلوکز و تک قندی‌های دیگر تبدیل می‌نماید (۱۳). ترکیبات بازدارنده با اتصال به جایگاه فعال آنزیم از ورود سوبسترا ممانعت نموده و مانع از کاتالیز واکنش توسط

روش رنگ سنجی (DNS) 3,5-Dinitrosalicylic acid انجام شد (۱۸). محلول واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر PBS حاوی ۰/۵mg/ml آنزیم آلفاآمیلاز (شرکت سیگما) و غلظت‌های متوالی (۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۱۲، ۳۹) از عصاره متابولیت‌ها در لوله‌های آزمایش بود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۲۵ °C، ۵۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته ۱٪ در PBS اضافه شد. سپس واکنش با افزودن یک میلی‌لیتر DNSA متوقف گردید. مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد و پس از سرد شدن با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و جذب نوری نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. از آکاربوز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در محاسبه درصد مهارکنندگی نمونه‌ها میزان مالتوز نمونه‌ها بر اساس منحنی کالیبراسیون مالتوز که بر مبنای ۷۰-۰ درصد (V/W) رسم شده بود محاسبه گردید. سپس میزان درصد بازدارندگی با استفاده از معادله زیر به‌دست آمد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = [(A_c - A_{bc}) - (A_a - A_{ab}) / (A_c - A_{bc})] \times 100$$

$A_c$ : جذب نوری واکنش حاوی آنزیم و بدون مهارکننده

$A_{bc}$ : جذب نوری واکنش بلانک فاقد آنزیم و حاوی حلال

$A_a$ : جذب نوری واکنش حاوی نمونه مورد آزمون (غلظت‌های مختلف عصاره) و آنزیم

$A_{ab}$ : جذب نوری واکنش بلانک حاوی نمونه مورد آزمون بدون آنزیم

(و) ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات با فعالیت بازدارنده:

فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات دارای فعالیت بازدارنده آنزیمی علیه رده‌های سلولی نرمال اندوتلیال بند ناف انسان (HUVEC) در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

به‌این منظور از روش رنگ‌سنجی با معرف تترازولیوم MTT استفاده شد. ۱۰۰  $\mu$ l محیط کشت DMEM حاوی تعداد نهایی

$1 \times 10^4$  سلول در میلی‌لیتر به هر چاهک در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و در دمای ۳۷ °C در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲ میکروگرم بر

میلی‌لیتر از هر عصاره در محیط کشت DMEM تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰  $\mu$ l به هر چاهک افزوده شد و میکروپلیت به‌مدت

Marine sponge agar و asparagine agar برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد (۷).

(ج) تولید و استخراج ترکیبات ثانویه از باکتری‌ها: جدایه‌های مورد نظر با تراکم  $10^6$  CFU/ml در محیط کشت نوترینت براث تغییر یافته کشت داده شدند. برای سازگاری محیط کشت با شرایط فیزیولوژیک باکتری‌های دریایی از آب دریا برای ساخت محیط کشت استفاده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸ ساعت مایع تخمیری حاصله برداشت شده و با استفاده از پمپ خلاء با فیلتر ۰/۴۸ میکرونی صاف گردید (۱۶). مایع تخمیری فیلتر شده با استفاده از روش استخراج مایع-مایع با حجم معادل از حلال اتیل‌استات در ۲ مرحله استخراج شد. فاز آلی استخراج شده جمع‌آوری و تحت خلا با سیستم تبخیر کننده چرخان خشک گردید.

(د) سنجش میزان بازدارندگی فعالیت آلفاگلوکوزیداز: غلظت‌های متوالی (۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۱۲، ۳۹) از متابولیت استخراج شده در بافر فسفات سدیم (pH 6.8) حل شد. ۱۰ میکرولیتر از هر غلظت با ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم و ۲۰ میکرولیتر پارا-نیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوزید (با غلظت ۲ mM) در میکروپلیت ۹۶ خانه مخلوط و در ۳۷ °C به مدت ۵ دقیقه گرم‌گذاری گردید. ۱۰ میکرولیتر آنزیم آلفا گلوکوزیداز (خریداری شده از شرکت سیگما) رقیق شده به میزان ۰/۲ U/ml (با استفاده از ۰/۰۱ M بافر فسفات سدیم) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ °C جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه خوانش میکروپلیت (BioTek) ثبت شد. در محلول مرجع (بلانک) به جای آنزیم از بافر فسفات سدیم استفاده شد. برای کنترل کیفی آزمون و مقایسه با نمونه‌های تست، از آکاربوز به‌عنوان کنترل مثبت در غلظت‌های مشابه با ترکیبات استخراج شده استفاده شد. میزان فعالیت بازدارندگی با معادله زیر محاسبه شد (۱۷).

$$\text{درصد بازدارندگی} = [1 - (\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{blank}})] \times 100$$

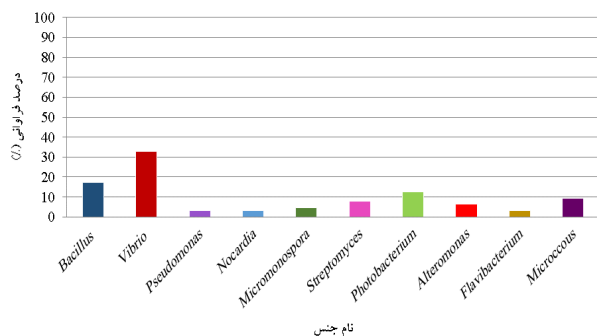
(ه) سنجش میزان بازدارندگی فعالیت آلفاآمیلاز: سنجش میزان مهار آنزیم آلفاآمیلاز توسط ترکیبات استخراج شده بر اساس

و 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') برای تکثیر ژن 1492R (5'ACGGCTACCTTGTTACGA3') مربوطه استفاده شد (۲۳). محصول PCR طبق دستورالعمل شرکت Promega کره جنوبی آماده‌سازی و به شرکت مزبور ارسال شد. تعیین توالی ژن 16SrRNA با استفاده از روش Sanger و تکنیک Tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit انجام گردید. شناسایی و تعیین میزان شباهت ژن 16SrRNA جدایه‌ها با سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم افزار Megablast انجام شد.

ی) تجزیه و تحلیل آماری: آزمون‌های جداسازی و ارزیابی تنوع باکتری‌ها با سه تکرار انجام شد. نتایج به صورت میانگین و درصد فراوانی بیان شد. نتایج سنجش فعالیت بازدارندگی متابولیت‌ها علیه آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز با در نظر گرفتن ۳ تکرار انجام شد. تعیین  $IC_{50}$  بر اساس آزمون رگرسیون و با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 6 انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $IC_{50} \pm$  خطای استاندارد (SE) بیان گردید. نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات بازدارنده نیز بصورت میانگین  $IC_{50} \pm$  خطای استاندارد (SE) ارائه شد.

#### یافته‌ها

الف) در کل تعداد ۱۰۵ باکتری از نمونه‌های اسفنج پیرامون جزیره هرمز جداسازی گردید. از این تعداد، ۶۴ جدایه از نمونه‌های اسفنج هالیکلونا و ۴۱ جدایه از نمونه‌های اسفنج نیفاتس جداسازی شدند. نتایج شناسایی اولیه باکتری‌ها و درصد فراوانی هر یک از آن‌ها در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است.



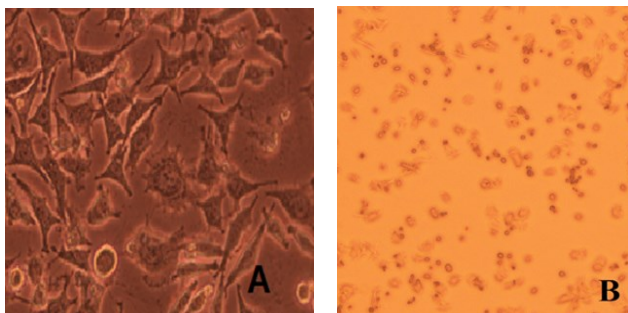
نمودار ۱: تنوع زیستی باکتری‌های جدا شده از اسفنج هالیکلونا.

۳۶ ساعت دیگر با شرایط قبلی گرمخانه‌گذاری گردید. پس از اتمام دوره ۵۰  $\mu$ l محلول MTT با غلظت ۵mg/ml افزوده و ۳ ساعت با شرایط قبلی گرمخانه‌گذاری گردید. بدنبال آن ۱۰۰  $\mu$ l معرف حل‌کننده حاوی DMSO و متانول با نسبت ۴ به ۱ به هر چاهک افزوده شد. جذب هر چاهک بوسیله Microplate reader در طول موج ۵۵۰ nm ثبت گردید. این آزمون با سه تکرار انجام شد و فعالیت سیتوتوکسیک هر نمونه با معادله زیر محاسبه شد.  $IC_{50}$  نمونه‌ها با رسم منحنی دوز- پاسخ با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 6 تعیین شد (۱۹).

ز) شناسایی جدایه‌های مولد ترکیبات ثانویه بازدارنده: جدایه‌های دارای فعالیت بازدارندگی بر اساس استراتژی شناسایی چند وجهی باکتری‌ها که در برگیرنده ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیک می‌باشد، مورد شناسایی قرار گرفتند. مورفولوژی میکروسکوپی جدایه‌های مولد منتخب با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم بررسی گردید. مورفولوژی ماکروسکوپی شامل میزان رشد سویه‌ها، رنگ کلونی، تشکیل اسپور و تولید پیگمان محلول در آب بود. خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌ها با بررسی رشد آن‌ها در محدوده تعیین شده دما، pH و شوری (۲۰) و همچنین تولید آنزیم‌های ویژه شامل اکسیداز، کاتالاز، نیترات ردوکتاز و آمیلاز سنجش شد (۲۱).

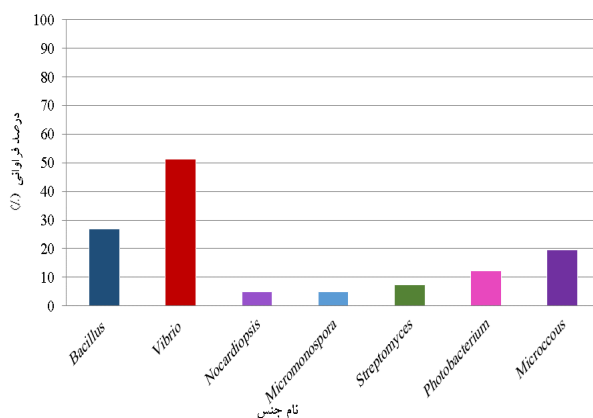
ض) شناسایی ژنتیکی جدایه‌های مولد: استخراج DNA ژنومی جدایه‌های مولد با استفاده از روش استخراج CTAB انجام شد (۲۲). به‌ادین منظور پس از تهیه بیومس مناسب مراحل مختلف لیز سلولی، پروتین‌زدایی و خالص‌سازی DNA ژنومی صورت گرفت. کمیت DNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری بررسی و غلظت DNA ژنومی استخراج شده محاسبه شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر ژن 16SrRNA جدایه‌های منتخب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. از جفت پرایمرهای

د) ارزیابی سمیت ترکیبات استخراج شده از باکتری‌های مولد ترکیبات بازدارنده: نتایج سنجش سمیت ترکیبات بازدارنده نشان داد که ترکیبات استخراج شده از جدایه HN 235 بر روی رده سلولی اندوتلیال بند ناف انسانی HUVEC با  $IC_{50}$  به میزان  $56/78 \mu\text{g/ml}$  بالاترین فعالیت سیتوتوکسیک را داشته است. بررسی تصاویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده و کنترل کاهش قابل ملاحظه تعداد سلول‌های زنده و تغییرات مورفولوژیک آن‌ها را تایید نمود (شکل ۲). ترکیبات بازدارنده استخراج شده از ۳ جدایه توانمند شامل HH 124، HH 165 و HN 231 در غلظت‌های مورد آزمون فعالیت سیتوتوکسیک نشان ندادند.



شکل ۲: تاثیر فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات بازدارنده بر مورفولوژی و فراوانی رده سلولی HUVEC. A. سلول‌های موجود در چاهک کنترل B. سلول‌های تیمار شده (بزرگنمایی 200X).

و) شناسایی جدایه‌های مولد ترکیبات بازدارنده: نتایج شناسایی خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی جدایه‌ها را می‌توان در جدول ۲ مشاهده نمود. نتایج آنالیز تطابق توالی‌های به دست آمده با استفاده از ژن 16SrRNA بیانگر همولوژی حدود ۹۷ تا ۱۰۰ درصدی میان جدایه‌های مولد ترکیبات بازدارنده با سویه‌های شاخص ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) بود. جدایه HH 165 به میزان ۹۹/۸۸ درصد با سویه *Bacillus pumilus* ATCC 7061 تشابه داشت. همچنین نتایج نشان دادند که جدایه HH 124 به میزان ۹۹/۴۷ درصد با سویه *Pseudomonas lurida* P513/18 تشابه داشت. در حالیکه جدایه HN 231 به میزان ۱۰۰ درصد با سویه تشابه جدایه HN 235 با سویه *Streptomyces enissocaeilis* 10b تشابه داشت.



نمودار ۲: تنوع زیستی باکتری‌های جدا شده از اسفنج نیفاتس.

ب) سنجش میزان بازدارندگی از فعالیت آلفاگلوکوزیداز: ارزیابی فعالیت بازدارندگی ترکیبات استخراج شده از ۱۰۵ جدایه به دست آمده از نمونه‌های اسفنج نشان داد که ۳ جدایه مولد ترکیبات مهارکننده فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز با مقادیر  $IC_{50}$  کمتر از  $1250 \mu\text{g/ml}$  بودند. در میان متابولیت‌های استخراج شده بیشترین فعالیت بازدارنده متعلق به جدایه HH165 با  $IC_{50}$  به میزان  $248/0 \mu\text{g/ml}$  بود (جدول ۱).

ج) سنجش میزان بازدارندگی از فعالیت آلفاآمیلاز: ارزیابی فعالیت بازدارندگی ترکیبات استخراج شده از ۱۰۵ جدایه به دست آمده از نمونه‌های اسفنج نشان داد که ۴ جدایه مولد ترکیبات مهارکننده فعالیت آنزیم آمیلاز با مقادیر  $IC_{50}$  کمتر از  $1250 \mu\text{g/ml}$  بودند. در میان ترکیبات استخراج شده بیشترین فعالیت بازدارنده متعلق به جدایه HH 165 با مقدار  $IC_{50}$   $4/159 \mu\text{g/ml}$  بود (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج غلظت‌های بازدارنده از فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز توسط ترکیبات استخراج شده.

جدایه	غلظت بازدارنده	
	آلفا آمیلاز	آلفا گلوکوزیداز
	<b>IC50 ±SE (µg/ml)</b>	
<i>Pseudomonas lurida</i> HH 124	$397/4 \pm 29/36$	$329/6 \pm 25/27$
<i>Bacillus pumilus</i> HH 165	$159/4 \pm 11/43$	$248/0 \pm 17/61$
<i>Bacillus tequilensis</i> HN 231	$670/9 \pm 26/11$	$1000 <$
<i>Streptomyces enissocaeilis</i> HN 235	$420/0 \pm 250/54$	$366/8 \pm 26/78$
Acarbose	$78/32 \pm 15/14$	

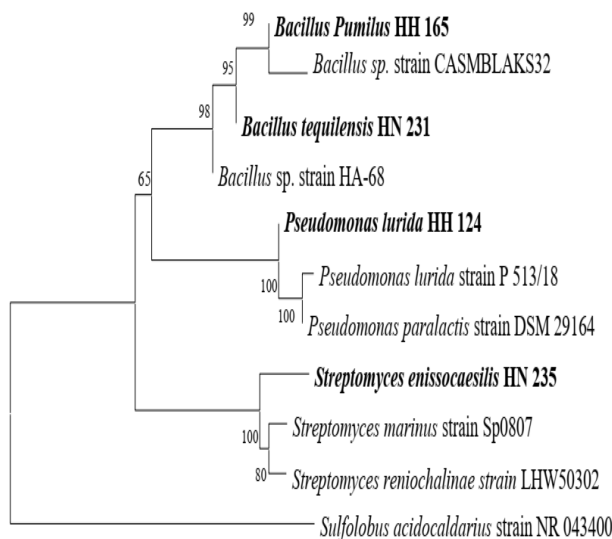
جدول ۲: ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌های مولد ترکیبات بازدارنده.

ویژگی‌ها	<i>Bacillus pumilus</i> HH 165	<i>Bacillus tequilensis</i> HN 231	<i>Pseudomonas lurida</i> HH 124	<i>Streptomyces enissocaeilis</i> HN 235
واکنش گرم	+	+	-	+
تولید اسپور	+	+	-	-
گلوکز	+	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+
زایلوز	+	+	-	+
آرابینوز	-	+	-	+
رامنوز	-	-	-	+
سوکروز	+	+	-	-
رافینوز	-	+	+	+
گالاکتوز	+	+	-	+
اینوزیتول	-	-	+	+
لاکتوز	-	+	-	+
والین	+	+	+	-
آرژینین	+	-	-	+
اورنیتین	+	-	-	-
آسپاراژین	+	-	-	+
محدوده دمای رشد °C	۵-۴۵	۵-۴۵	۲۰-۴۵	۱۰-۴۰
محدوده pH رشد	۵-۹	۵-۹	۶-۹	۵-۹
محدوده تحمل شوری (ppt)	۰-۱۰	۰-۱۰	۰-۸	۰-۱۰
اکسیداز	+	+	+	-
اکسیداسیون تخمیر	+/-	+/-	+/+	+/-
کاتالاز	+	+	+	+
سولفید هیدروژن	-	-	-	-
احیا نیترات	-	-	+	+
وژ-پروسکوئر	+	+	-	-
ژلاتین	-	-	+	-
سیترات	-	-	+	+
آرژینین دهیدرولاز	-	-	-	+
اورنیتین دکربوکسیلاز	-	-	+	-
لیزین دکربوکسیلاز	-	-	+	-
رنگدانه	+	-	-	-

### بحث

در سال‌های اخیر برنامه‌های گسترده‌ای برای اکتشاف ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزیمی از منابع دریایی در سرتاسر دنیا طراحی و اجرا شده است. باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های دریایی نقش برجسته‌ای در بیوتکنولوژی میکروبی دارند و به‌این منظور در این پژوهش مورد مطالعه و غربالگری قرار گرفتند (۲۴ و ۲۵). بررسی الگوی تنوع زیستی باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های

NRRL B-16365 معادل ۹۷/۸۴ درصد بود. توالی ژن 16SrRNA سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه با شماره‌های دستیابی OP801416.1، OP801623.1، OP801418.1، OP801669.1 در بانک ژن NCBI ثبت شدند. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک میان سویه‌های مولد متابولیت‌های بازدارنده و نزدیکترین سویه‌های شاخص بر اساس توالی ژن 16SrRNA و یا استفاده از الگوی Neighbour joining نشان داد سویه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی رسم شده در ۳ خوشه مجزا قرار گرفته‌اند. سویه‌های HN 231 و HH 165 در یک خوشه مشترک واقع شدند اگرچه سویه HN 231 مسیر تکاملی جداگانه‌ای را تشکیل داده است. در خوشه دوم ایجاد شده سویه *Pseudomonas lurida* HH 124 قرار گرفتند که مسیر تکاملی جداگانه‌ای با سویه‌های دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با خود نشان داد. در خوشه بعدی سویه *Streptomyces enissocaeilis* HN 235 قرار گرفت که این سویه نیز خط تکاملی جداگانه‌ای را نشان داد (شکل ۳).



0.050

شکل ۳: درخت فیلوژنتیک سویه‌های مولد متابولیت‌های بازدارنده و نزدیکترین سویه‌های موجود بر اساس روش Neighbour joining. اعداد نشان داده شده در کنار گره‌ها بیانگر میزان Bootstrap است. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی ۵ نوکلئوتید در ۱۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. سویه *Sulfolobus acidocaldarius* strain NR 043400 به عنوان Outgroup در نظر گرفته شد.

اول پروفایل باکتریایی اسفنج‌ها در مکان‌های نمونه برداری مختلف با توجه به پارامترهای متعدد متغیر بوده و بیشتر باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی غیر قابل کشت می‌باشند (۳۰ و ۳۱ و ۳۲). نتایج سنجش فعالیت بازدارندگی ترکیبات استخراج شده نشان داد به ترتیب ۳ و ۴ جدایه معادل ۲/۸۶ و ۳/۸۱ درصد از کل باکتری‌های جداسازی شده، مولد ترکیبات مهارکننده فعالیت آنزیم‌های آلفاگلوکوزیداز و آلفاآمیلاز در غلظت‌های معنادار بودند. ترکیبات مهار کننده فعالیت آنزیم‌های مذکور می‌توانند نقش مهمی در کاهش جذب گلوکز در خون از طریق مهار فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز یا آلفاگلوکوزیداز به‌عنوان آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات‌ها ایفا نمایند (۳۳). در مطالعه حاضر میزان  $IC_{50}$  فعالیت این متابولیت‌ها از  $159/4 \mu g/ml$  تا  $670/9$  برای آلفاآمیلاز متغیر بود. این در حالی است که این میزان برای عصاره‌های جلبکی نمونه‌برداری شده از خلیج فارس حدود  $420 \mu g/ml$  تا  $7/5$  گزارش شده است (۳۴). در مطالعه دیگری مقدار  $IC_{50}$  فعالیت مهارکنندگی ترکیبات استخراج شده از باکتری *Streptomyces longisporoflavus* به‌میزان  $162/3 \mu g/ml$  گزارش شد (۳۵). اگرچه مقایسه میزان فعالیت مهارکنندگی عصاره ترکیبات استخراج شده به‌دلیل تفاوت غلظت یا خلوص ماده موثره در این عصاره‌ها قابل اتکا نمی‌باشد لیکن ارزیابی اولیه‌ای از توان بازدارندگی در مطالعات غربالگری ارائه می‌نماید.

در مطالعات غربالگری ترکیبات طبیعی برای سنجش سمیت سلولی ترکیبات استخراج شده از رده‌های سلولی انسانی یا حیوانی به‌عنوان مدل استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر نیز از سلول‌های HUVEC که یک رده سلولی طبیعی اندوتلیال بندناف جنین انسان است به‌عنوان مدل برون‌تنی استفاده شد. این رده سلولی از سایر رده‌های سلولی طبیعی در دسترس‌تر است. می‌توان آن را با پروتکل‌های استاندارد با حداقل نیازهای غذایی و محیطی کشت نگهداری کرد. همچنین از منابع تجاری قابل خریداری است، بسیاری از مارکرهای مهم داخل سلولی را تولید می‌کند و نتایج حاصل از تست روی آن را می‌توان به

نمونه‌برداری شده از پیرامون جزیره هرمز نشان داد که نمونه‌های متعلق به جنس *هالیکلونا* با حدود ۱۰ جنس مختلف از باکتری‌ها، میزبان طیف متنوع تری از باکتری‌ها بودند. در حالیکه در نمونه‌های اسفنج *نیفاتس* این تنوع به ۷ جنس باکتری محدود شد (نمودارهای ۲ و ۳). لازم به ذکر است که این الگو تنها به باکتری‌های قابل کشت با روش‌های جداسازی مورد استفاده در این مطالعه منحصر می‌شود و نمی‌تواند گویای تنوع باکتریایی اسفنج میزبان باشد. باین‌حال، به‌دلیل یکسان بودن تکنیک‌های جداسازی از نظر مقایسه تنوع باکتری‌های قابل کشت در نمونه‌های مورد بررسی، قابل توجه می‌باشد. در این مطالعه غلبه جنس‌های *ویبریو* و *باسیلوس* در نمونه‌ها مشهود بود. در برخی مطالعات با هدف جداسازی اکتینوباکتری‌ها غلبه استرپتومایسس‌ها در نمونه‌های اسفنج گزارش شد. برای مثال ژانگ و همکارانش در یک مطالعه اعلام نمودند که  $73/6$  درصد از جدایه‌های به‌دست آمده از اسفنج *Hymeniacidon perleve* به گونه‌های *استرپتومایسس* تعلق داشتند (۲۶). نتایج مطالعه دیگری در زمینه تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج دریایی *Iotrochota sp.* نشان داد اعضای جنس *استرپتومایسس* غالب جمعیت اکتینوباکتری‌های مرتبط با این اسفنج را تشکیل می‌دادند (۲۷). نتایج بررسی تنوع زیستی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج *nigra Dendrilla* نشان داد استرپتومایسس‌ها  $23/91$  درصد از جدایه‌های اکتینوباکتری را شامل می‌شدند (۲۸). نتایج مطالعه گذری در سال ۲۰۰۹ نشان داد که  $25/43$  درصد باکتری‌های جداسازی شده از اسفنج *هالیکلونا* متعلق به اکتینوباکتری‌ها بود که از این میان ۷۰ درصد را گونه‌های استرپتومایسس را تشکیل می‌دادند (۲۹). به نظر می‌رسد دلیل اصلی این تفاوت الگوی تنوع زیستی با هدف مطالعات انجام شده و اعمال تیمارهای انتخابی و محیط‌های کشت اختصاصی برای جداسازی باکتری‌ها مرتبط می‌باشد. در حالیکه در مطالعه حاضر از محیط‌های کشت اختصاصی استفاده نشد.

دستیابی به باکتری‌های مولد ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزیمی روندی پیچیده و در عین حال دارای اهمیت می‌باشد. از جنبه



ماهیت این جدایه‌ها را نشان داد. بر این اساس، سویه‌های مولد با عنوان *Bacillus pumilus* HH 165، *Pseudomonas lurida* HH 124، *Bacillus tequilensis* HN 231 شناسایی شدند. همچنین سویه *Streptomyces* sp. HN 235 که دارای تشابه ۹۷/۸۴ درصدی با نزدیکترین سویه‌های شاخص ثبت شده در بانک ژن بود از نظر ویژگی‌های فنوتیپی نتایج متفاوتی نشان داد. از این‌رو برای مطالعات پیشرفته شناسایی پیشنهاد گردید.

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر منجر به ایجاد درک جدیدی از تنوع زیستی باکتری‌های قابل کشت مرتبط با جوامع اسفنج پیرامون جزیره هرمز گردید. همچنین پتانسیل بالای فعالیت بازدارندگی ترکیبات تولید شده توسط این باکتری‌ها در مقابل آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز مشخص شد. این نتایج می‌تواند شاهد دیگری برای نقش فعال جمعیت‌های باکتریایی مرتبط با اسفنج‌ها ارائه نماید. مطالعه حاضر یک استراتژی کارآمد را برای غربالگری باکتری‌ها از اسفنج‌های دریایی ارائه نمود. نتیجه این پژوهش دستیابی به ۴ سویه باکتری مولد ترکیبات بازدارنده در مقابل آنزیم‌های دخیل در بیماری دیابت بود که در نهایت عدم سمیت ۳ متابولیت استخراج شده در مقابل سلول‌های طبیعی انسانی را تایید نمود. بنابر این در صورت تایید آزمون‌های تکمیلی فارماکولوژیک می‌توان از سویه‌های مذکور به‌عنوان گزینه‌های بالقوه در مطالعات درون‌تنی داروهای ضددیابت استفاده نمود.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها و داده‌سازی رادر این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی و همکاری کارکنان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و پژوهشکده

مدل‌های درون‌تنی تعمیم داد (۳۶). نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک نشان داد ترکیبات ثانویه استخراج شده از جدایه‌های HN 235 در مقابل رده سلولی HUVEC فعالیت سیتوتوکسیک معادل  $78/65 \mu\text{g/ml}$  نشان دادند. از این‌رو این جدایه به دلیل سمیت ترکیبات استخراج شده از مطالعات تکمیلی حذف شد. تولید ترکیبات سیتوتوکسیک توسط باکتری‌های همزیست با اسفنج‌ها در مطالعات مختلف گزارش شده است. ارگانسیم‌های دریایی از قبیل اسفنج‌ها با تولید ترکیبات سیتوتوکسیک راهبرد دفاعی خود را در مقابل شکارچیان و پاتوژن‌ها در زیستگاه‌هایشان اعمال می‌نمایند (۳۷). بر اساس نظریه وجود منشاء میکروبی بخشی از متابولیت‌های ثانویه در ارگانسیم‌های دریایی، لزوماً باید گونه‌های معینی از باکتری‌های همزیست بطور دائمی و اختصاصی با ارگانسیم میزبان مرتبط بوده و به ایفای نقش بپردازند (۱۰). نتایج بررسی سمیت همچنین نشان داد ترکیبات بازدارنده استخراج شده از جدایه‌های HH 165، HH 124 و HN 231 در غلظت‌های مورد بررسی فاقد سمیت بودند. این نتیجه می‌تواند ضمن تایید ایمنی این ترکیبات، ضریب درمانی آن‌ها را در مطالعات درون‌تنی ارتقاء بخشد. اگرچه ضروری است سایر اثرات فارماکولوژیک این ترکیبات بر آنزیم‌های دخیل در متابولیسم انسانی مورد بررسی قرار گیرند.

با توجه به نتایج آزمون‌های شناسایی پلی‌فازی می‌توان بیان نمود که اکثر جدایه‌های منتخب، سویه‌های متفاوتی از سویه‌های شاخص بوده و می‌توانند به‌عنوان منابعی جدید از ترکیبات زیست فعال مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. آنالیز تطابق ژنتیکی سویه‌های منتخب با نزدیکترین سویه‌ها بر اساس ژن 16SrRNA انجام شد. توالی ژن 16SrRNA به‌عنوان یک ژن ارتولوگ و ساعت مولکولی بطور گسترده در مطالعات فیلوژنتیک باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. ترتیب توالی این ژن به میزان بالایی حفاظت شده و اطلاعات دقیقی را برای تمایز در سطح گونه و جنس فراهم نموده است (۳۸). مطابقت نتایج حاصل از شناسایی فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌های مولد با نتایج شناسایی ژنتیک آن‌ها

اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در اجرای این تحقیق  
تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

### References

1. Khan S, Malik A. Exploring the Diversity of Marine Microbiome in Response to Changes in the Environment. *Microbiomes and the Global Climate Change*: Springer; 2021. p. 81-92.
2. Gozari M, Alborz M, El-Seedi HR, Jassbi AR. Chemistry, Biosynthesis and Biological Activity of Terpenoids and Meroterpenoids in Bacteria and Fungi Isolated from Different Marine Habitats. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;210:112957.
3. Voser TM, Campbell MD, Carroll AR. How different are marine microbial natural products compared to their terrestrial counterparts? *Natural Product Reports*. 2022;39(1):7-19.
4. Lu W-Y, Li H-J, Li Q-Y, Wu Y-C. Application of marine natural products in drug research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2021;35:116058.
5. García-Jiménez B, García JL, Nogales J. FLYCOP: metabolic modeling-based analysis and engineering microbial communities. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i954-i63.
6. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res*. 2013;168(6):311-32.
7. Gozari M, Bahador N, Mortazavi MS, Eftekhar E, Jassbi AR. An “olivomycin A” derivative from a sponge-associated *Streptomyces* sp. strain SP 85. *3 Biotech*. 2019;9(12):439-51.
8. Gozari M, Bahador N, Jassbi AR, Mortazavi M, Eftekhar E. 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*. 2018;17(2):413-26.
9. Gozari M, Bahador N, Jassbi AR, Mortazavi MS, Hamzehei S, Eftekhar E. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable *actinobacteria* from the Oman Sea sediments. *Acta Oceanologica Sinica*. 2019;38(12):84-90.
10. Hadfield MG. Developmental symbiosis: a sponge larva needs symbiotic bacteria to succeed on the benthos. *Curr Biol*. 2021;31(2):R88-R90.
11. Posadas N, Baquiran JIP, Nada MAL, Kelly M, Conaco C. Microbiome diversity and host immune functions influence survivorship of sponge holobionts under future ocean conditions. *The ISME Journal*. 2022;16(1):58-67.
12. Imada C. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87(1):59-63.

13. Mayer AM, Pierce ML, Howe K, Rodríguez AD, Tagliatela-Scafati O, Nakamura F, et al. Review Marine Pharmacology in 2018: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Pharmacological Research*. 2022;106391.
14. Banerjee P, Mandhare A, Bagalkote V. Marine natural products as source of new drugs: an updated patent review (July 2018-July 2021). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2022;32(3):317-63.
15. Hooper J. Sponguide. Guide to sponge collection and identification (version 2003). John NA Hoo-per Qld Museum, Australia. 2003.
16. Seidel V. Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Natural products isolation*. 2012:27-41.
17. Chen Z, Hao J, Wang L, Wang Y, Kong F, Zhu W. New  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-9.
18. Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2000;64(5):1041-3.
19. Peng S, Zhao M. *Pharmaceutical bioassays: methods and applications*: John Wiley & Sons; 2009.
20. Goto M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd edn, vol 2, part B. Springer, USA. 2005:404-6.
21. Williams S, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E, Sneath P, Sackin M. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*. 1983;129(6):1743-813.
22. Kieser T. *Practical streptomyces genetics*: John Innes Foundation, Norwich, England.; 2000.
23. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(8):3233-41.
24. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res*. 2014;169(4):262-78.
25. Heim NA, Knope ML, Schaal EK, Wang SC, Payne JL. Cope's rule in the evolution of marine animals. *Science*. 2015;347(6224):867-70.
26. Zhang H, Lee YK, Zhang W, Lee HK. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90(2):159-69.
27. Jiang S, Li X, Zhang L, Sun W, Dai S, Xie L, et al. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Mar Biol*. 2008;153(5):945-52.

28. Selvin J, Gandhimathi R, Kiran GS, Priya SS, Ravji TR, Hema T. Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgoland marine research*. 2009;63(3):239-47.
29. Gozari M. Selective Isolation of the Persian Gulf Sponge-associated Actinobacteria and Evaluation of Cytotoxic and Antioxidant activity of Their Metabolites. *Journal of Oceanography*. 2020;11(41):39-48.
30. Colwell RR, Grimes DJ. *Nonculturable microorganisms in the environment*: ASM press; 2000.
31. Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, Ibrahim F, DeLong EF, Hutchinson CR. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(8):4840-9.
32. Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(1):434-44.
33. Kaur N, Kumar V, Nayak SK, Wadhwa P, Kaur P, Sahu SK. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*. 2021;98(4):539-60.
34. Pirian K, Moein S, Sohrabipour J, Rabiei R, Blomster J. Antidiabetic and antioxidant activities of brown and red macroalgae from the Persian Gulf. *Journal of Applied Phycology*. 2017;29(6):3151-9.
35. Akshatha V, Nalini M, D'souza C, Prakash H. Streptomycete endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. *Letters in applied microbiology*. 2014;58(5):433-9.
36. Cao Y, Gong Y, Liu L, Zhou Y, Fang X, Zhang C, et al. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*. 2017;37(12):1359-69.
37. Zhang S, Song W, Nothias L-F, Couvillion SP, Webster N, Thomas T. Comparative metabolomic analysis reveals shared and unique chemical interactions in sponge holobionts. *Microbiome*. 2022;10(1):1-14.
38. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*. 2020;33(4):e00053-19.