جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینوباکترهای کمیاب مولد آنتی بیوتیک علیه مخمر *Candida albicans*

مرضیه عبدی[۱]، جواد حامدی[۲]*، ستاره حقیقت[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استاد تمام میکروبیولوژی و رئیس کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران.
۳- :استادیار میکروبیولوژی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** تهران، دانشگاه تهران، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم. تلفن : ۶۱۱۱۳۵۵۶، فاکس ۶۶۵۹۲۹۵۶ ،. ایمیلjhamedi@ut.ac.ir

دریافت مقاله: بهمن نود و پنج پذیرش برای چاپ: فروردین نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: *با شیوع عفونت‌های قارچی و به دنبال آن افزایش استفاده از داروهای ضدقارچی افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه‌های Candidaنسبت به ترکیبات ضدقارچی دیده می شود. اکتینومیست‌ها همواره به عنوان یک منبع اصلی تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌های جدید و متابولیت‌های ثانویه متنوع، مورد توجه بوده‌اند. اما در دو دهه گذشته میزان در کشف متابولیت های جدید جداشده از اکتینومایست های بارز (اعضای جنس Streptomyces) کاهش یافته است. بنابراین اکتینومیست های کمیاب به عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی از محیط مورد توجه قرار گرفته اند. هدف این پژوهش جداسازی اکتینومیست‌های نادر تولیدکننده ترکیبات ضدقارچی از خاک‌های ایران بوده است.*

روش کار: *نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از محیط‌های مختلف پس از تیمار و رقیق‌سازی در محیط ISP2 کشت داده شدند. جدایه‌ها روش‌های مورفولوژیک و بررسی میکروسکوپی کلنی‌ها و تست DAP، شناسایی و جداسازی شدند.در مرحله بعد اثر مایع تخمیر جدایه‌ها علیه مخمر Candida albicans با استفاده از روش چاهک در پلیت بررسی شد.*

یافته ها: *از بین ۵۰ جدایه اکتینوباکتر حاصل، ۹ جدایه دارای خاصیت ضدقارچی به دست آمد. نتایج آنالیز مولکولی ژن 16S rRNA نشان می دهد که این جدایه ها متعلق به جنس‌های Nocardia، Actinomadura، Nocardiopsis، Streptomyces، Saccharomonospora و Martelella بودند. در بین جدایه های به دست آمده سویه UTMC2325 با هاله مهار رشد (۳۴ میلی متر) بر علیه C. albicans ، با شباهت ۹۸،۸۴٪ به Nocardia rhamnosiphila بیشترین فعالیت زیستی را داشت.*

نتیجه گیری: *این پژوهش نشانگر غنی بودن خاک‌های ایران از اکتینومیست های فعال تولیدکننده ترکیبات ضد قارچی است.*

واژگان کلیدی: آنتی بیوتیک، اکتینوباکترها، کاندیدا آلبیکانس، نوکاردیا.

مقدمه

با توجه به استفاده بیش از حد یا سوء استفاده از آنتی بیوتیک بیش از یک دوره طولانی مدت، بسیاری از عوامل بیماری‌زا به درمان آنتی بیوتیکی مقاوم شده‌اند. این عوامل بیماری‌زا با داشتن تعداد زیادی از ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک در بین ژنوم اصلی و پلاسمیدها سبب محدود شدن انتخاب های درمانی شده است(۱). بنابراین، نیاز بسیار زیادی برای کشف و توسعه آنتی بیوتیک های جدید به عنوان عامل موثر در برابر عوامل بیماری‌زای کشنده که باعث تهدید و عفونت در برابر زنده بودن هدف قرار گرفته است وجود دارد. یکی از عوامل بیماری زا که امروزه در حال مقاوم شدن به آنتی بیوتیک‌ها است، مخمر *Candida albicans* می‌باشد. این قارچ فرصت

طلب که در فلور طبیعی دهان، واژن و روده یافت می‌شود، از طریق جوانه زدن اشکال مخمری تکثیر می یابد. این مخمر توانایی ایجاد عفونت های حاد و مزمن در دهان، واژن، ریه و دستگاه گوارش را دارد(۲). این قارچ در افراد با سیستم ایمنی تضعیف یافته مثلاً در افراد مبتلا به ایدز ، سرطان، پیوند مغز استخوان و یا پیوند اعضاء باعث عفونت های منجر به مرگ و میر می‌شود(۳, ۴) .

با شیوع عفونت‌های قارچی و به دنبال آن افزایش استفاده از داروهای ضدقارچی مانند آزول‌ها، پلی‌ان‌ها و اکتینوکاندین‌ها شاهد افزایش قابل ملاحظه مقاومت گونه‌های *Candida* نسبت به ترکیبات ضدقارچی هستیم(۵).

خاک اکوسیستم متنوعی بوده که شرایط مناسب برای رشد ارگانیسم‌های بی‌شماری را تامین می‌کند. میکروارگانیسم‌ها از منابع مهم مواد دارویی طبیعی می‌باشند. در میان جمعیت پروکاریوت‌های جهان، اکتینومیست‌های رشته‌ای، میکسوباکتری ها، سودوموناس‌ها و سیانوباکترها و در بین میکروارگانیسم‌های یوکاریوت، قارچ‌های رشته‌ای توانایی تولید تعداد متنوعی از متابولیت‌های شیمیایی را دارند(۶).

اکتینومیست‌ها باکتری‌هایی گرم مثبت هستند که در دیواره آنها ترکیبات پپتیدوگلیکان، اسید تیکوئیک و پلی ساکارید وجود دارد(۷). اکتینومیست ها منبع اصلی آنتی‌بیوتیک های مهم بالینی هستند . اکثر این ترکیبات بسیار پیچیده و توسط شیمی ترکیبی سنتز می شوند. از لحاظ ساختاری و عملکردی ترکیبات فعال زیستی متنوعی از اکتینومیست ها به عنوان آنتی بیوتیک‌ها با عنوان ضد باکتری، ضد قارچ، ضد انگل، ضد ویروسی و ضد تومور جدا شده است(۸). این باکتریها همچنین مولد ترکیبات مهارکننده های آنزیم، اصلاح ایمنی، رشد گیاه و بسیاری از ترکیبات مفید دیگر هستند(۹). اگرچه مطالعات زیادی توسط دانشمندان برای جداسازی اکتینومیست ها، به عنوان منابع آنتی بیوتیک انجام شده، در دو دهه گذشته میزان کشف متابولیت های جدید جداشده از استرپتومایسس ها کاهش یافته است. بنابراین اکتینومیست های کمیاب به عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی مورد توجه قرار گرفته اند(۱۰) . اکتینومیست های کمیاب مولد گروه های مهمی از آنتی بیوتیک‌ها مانند ماکرولیدها، بتالاکتام-ها، آمینوگلیکوزیدها، گلیکوپپتیدها، لیپوپپتیدها، مهارکننده های آنزیم، پلی‌ان ها، آنتراسایکلین‌ها، نوکلئوزیدها، پپتیدها، پلی‌سایکلین ها و تتراسایکلین هستند(۱۱). این پژوهش با هدف جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت زیستی تعدادی از جدایه های اکتینوباکتر کمیاب جداشده از خاک های ایران بررسی شده است.

روش کار

نمونه‌های خاک از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شد و در ظروف استریل و در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا اشکال رویشی اکتینومیست‌ها و سایر باکتری‌ها کاهش یابند و اسپورهای اکتینومیست‌ها جدا شوند(۱۲).

برای جداسازی اکتینومیست‌ها از تیمارهای مختلف و روش رقیق سازی متوالی استفاده شد. نمونه‌ها رقیق شدند و برای جداسازی اکتینومیست‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} در محیط کشت اختصاصی ISP_2 (شامل ۱۰ گرم مالت، ۴ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم گلوکز، ۲ گرم کلسیم کربنات، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب دیونیزه) در pH ۷/۲±۲ کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور گرماگذاری شدند.

کلنی‌های اکتینومیست که ظاهری پودری و خشک داشتند در سطح آگار جداسازی شدند. شناسایی اولیه اکتینومیست‌ها براساس مشخصات مورفولوژی کلنی، اندازه کلنی، تولید اسپور و نیزمشخصات میکروسکوپی مسیلیوم هوایی، وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور انجام شد. جدایه‌های خالص شده برای مراحل بعد در محیط نگهداری(۲۰ %گلیسرول+ ISP_2 ۲ / ۱) در دمای ۷۰- درجه سلسیوس در کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران نگهداری شدند.

جهت انجام مراحل بعدی این جدایه‌ها به منظور فعال سازی ، بر روی محیط ISP_2 Agar کشت داده شدند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ^{oC} ۲۸ گرماگذاری شدند.

برای پیش کشت ml ۸ ازمحیط ISP2 Broth در فلاسک‌های ml۱۰۰ استفاده شد دیسک هایی به قطر ۱ سانتیمتر از محیط کشت جامد به محیط پیش کشت تهیه شده تلقیح گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای^{o}C۲۸ ±۲ در شیکرانکوباتور با دورrpm ۲۲۰ گرماگذاری شد.

در شرایط آسپتیک µl ۱۰۰ از محیط پیش کشت به ml۲۰محیط تخمیر (ISP2 Broth)در فلاسک ml۱۰۰ تلقیح شدند. فلاسک ها در شیکر انکوباتور در دمای^{o}C۲۸ و دور rpm۲۰۰ به مدت ۷ روز گرماگذاری گردید. بعد از پایان دوره تخمیر مرحله استخراج انجام شد. بعد از اطمینان از آلوده نبودن فلاسک‌ها، مایع رویی محیط تخمیر از زیست توده با استفاده از سانتریفوژ در دور rpm۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد.

بررسی اثرات ضدقارچی عصاره خام جدایه‌ها، به روش ایجاد چاهک، با استفاده از مخمر *Candida albicans* (PTCC 5027) انجام گرفت. مخمر مورد مطالعه از کلکسیون میکربی دانشگاه تهران تهیه شد. از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar)برای بررسی فعالیت ضدقارچی استفاده گردید و از مخمر *Candida albicans* سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد و به صورتی چمنی در پلیت کشت داده شد. مقدار۱۰۰میکرولیتر از

عصاره جدایه‌ها به چاهکهای ۶ میلیمتر ایجاد شده در محیط کشت PDAاضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. از محیط کشت القایی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. کلیه آزمایش ها با سه مرتبه تکرار انجام شد.

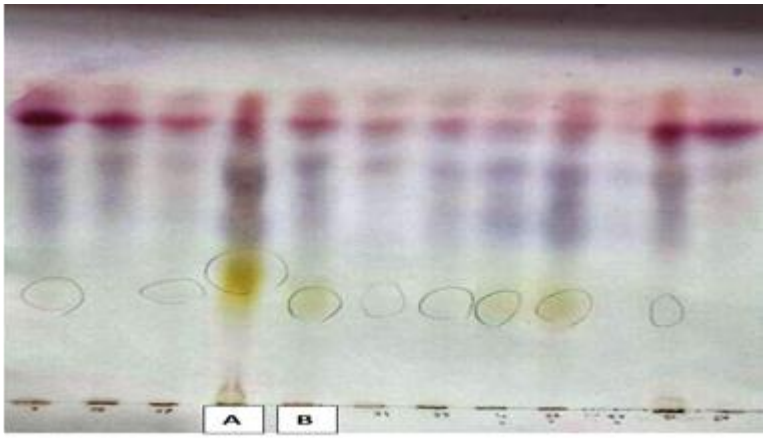
به منظور شناسایی اکتینومایست های جداشده از روش های مختلف شناسایی مورفولوژی (رنگ آمیزی گرم)، تاکسونومی شیمیایی (تعیین نوع ایزومر دی آمینوپایمیلیک اسید) و آنالیز مولکولی (تعیین ترادف ژن 16S rRNA) استفاده شد.

جهت تعیین نوع ایزومر مزو و ال آمینواسید دی پایمیلیک اسید (تست DAP) بیوماس سویه های جداشده در محیط ISP2 براث تهیه شده و پس از سانتریفوژ کردن نمونه، رسوب حاصل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس مقدار معینی از بیوماس خشک (حدود ۲۰ میلی گرم) با هاون کوبیده و در لوله‌های درپیچ دار ریخته شد و یا HCl ۶ مولار در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت هیدرولیز شد. پس از خشک کردن رسوب، نمونه ها در آب دیونیزه حل شد و سپس حدود ۱ میکرولیتر از محلول به دست آمده بر روی کاغذ واتمن شماره ۱ با کمک لوله مویین قرار داده شد. فرایند تفکیک به کمک سیستم حلالی آب مقطر-- HCl پیریدین-متانول با نسبت حجمی (۸۰:۲۶:۴:۱۰) پس از اشباع شدن تانک از حلال ها به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه و قرار دادن کاغذ به درون تانک انجام گرفت. پس از حدود ۵ ساعت کاغذ از تانک خارج و خشک شد. کاغذ حاصل با محلول ۰٫۱٪ نین هیدرین در استون اسپری و در آون با دمای ۱۰۰ درجه برای ظهور لکه ها قرار داده شد. سویه‌هایی که نتیجه تست آنها مزو بود، برای انجام سایر مراحل انتخاب گردید.

برای شناسایی مولکولی سویه مورد نظر و به منظور استخراج DNA، این سویه در فلاسک ۱۰۰ml حاوی ۱۰ ml محیط BHI با pH ۰/۲ ± ۷ تلقیح و در دمای دمای۲۸°C و دور ۲۰۰rpm به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرماگذاری گردید. پس از اطمینان از عدم آلودگی و کامل بودن رشد میسلیومی باکتری، بیومس سویه تهیه گردید(۱۳) . سپس مراحل بعدی استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت پویاژن آزما) طبق دستورالعمل انجام شد. به منظور بررسی موفق بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ ٪به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت در دستگاه ژل داک، باندها مشاهده شد . انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در این پژوهش از دو پرایمر عمومی با نامهای F9 و R1541 برای تکثیر ژن ۱۶SrRNA استفاده شد. این پرایمرهای عمومی به منظور تکثیر ژن ۱۶SrRNA با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴) . توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش و دمای اتصال مربوط به آنها به ترتیب زیر است: 9F: 5'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3' (Tm:60) و 1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC A -3' (Tm:60) . بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ ٪صورت گرفت. ژن تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز برای توالی یابی، به شرکت Macrogenکره جنوبی ارسال شدند.

یافته ها

در این پژوهش از بین جدایه های متعدد حاصل از کشت ۳۰ نمونه خاک بر روی محیط ISP2 آگار، ۵۰ جدایه که دارای ایزومر مزو در تست DAP بودند به عنوان اکتینومایست کمیاب در نظر گرفته شد. در روی کاغذهای TLC، اسید آمینه‌های موجود (به جز دی آمینوپایمیلیک اسید) در محلول هیدرولیز شده حاصل به رنگ بنفش و ارغوانی نمایان شده و جلوتر از لکه های DAP حرکت کردند. ولی مولکول های DAP (لکه های با رنگ سبز مایل به خاکستری) به دلیل قطبیت زیاد Rf پایینی را داشت. ایزومر فرم *L* R_f کمتری نسبت به ایزومر *meso* داشت(شکل ۱).



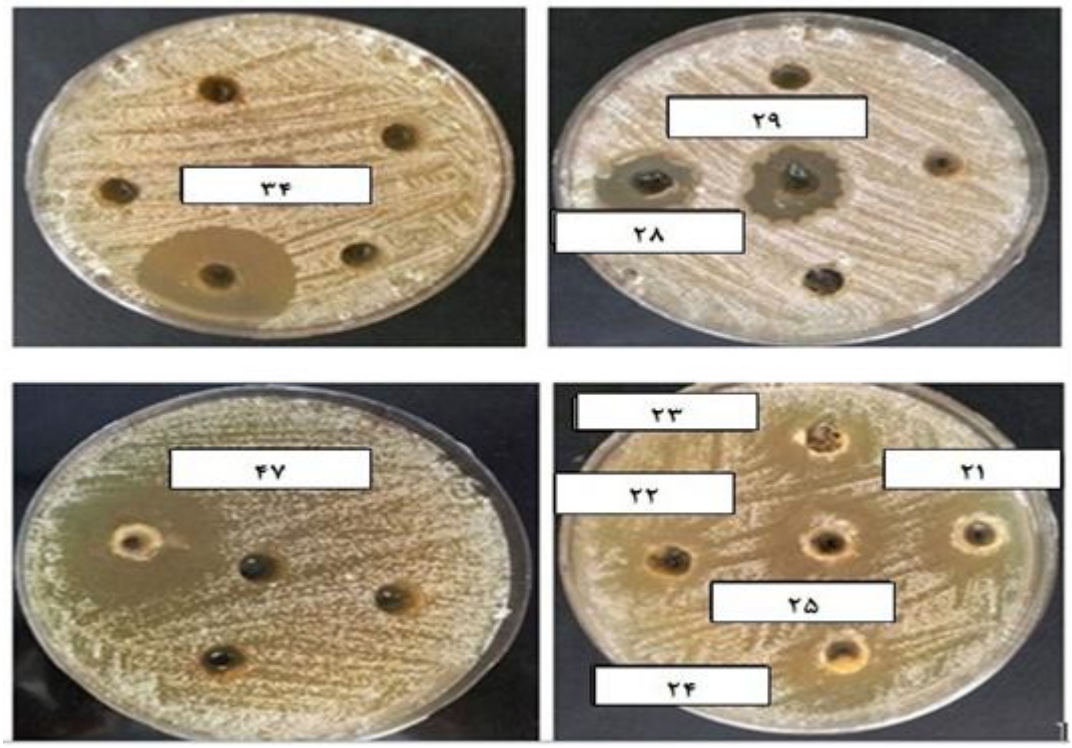
شکل۱- نمونه ای از پلیت TLC برای آنالیز تشخیص نوع ایزومر دی آمینوپایمیلیک اسید در بین جدایه های اکتینومایست، A: استاندارد ایزومر *LL* ، B: استاندارد ایزومر *meso* اسیدهای امینه دیگر به رنگ بنفش در بالای پلیت دیده می شوند.

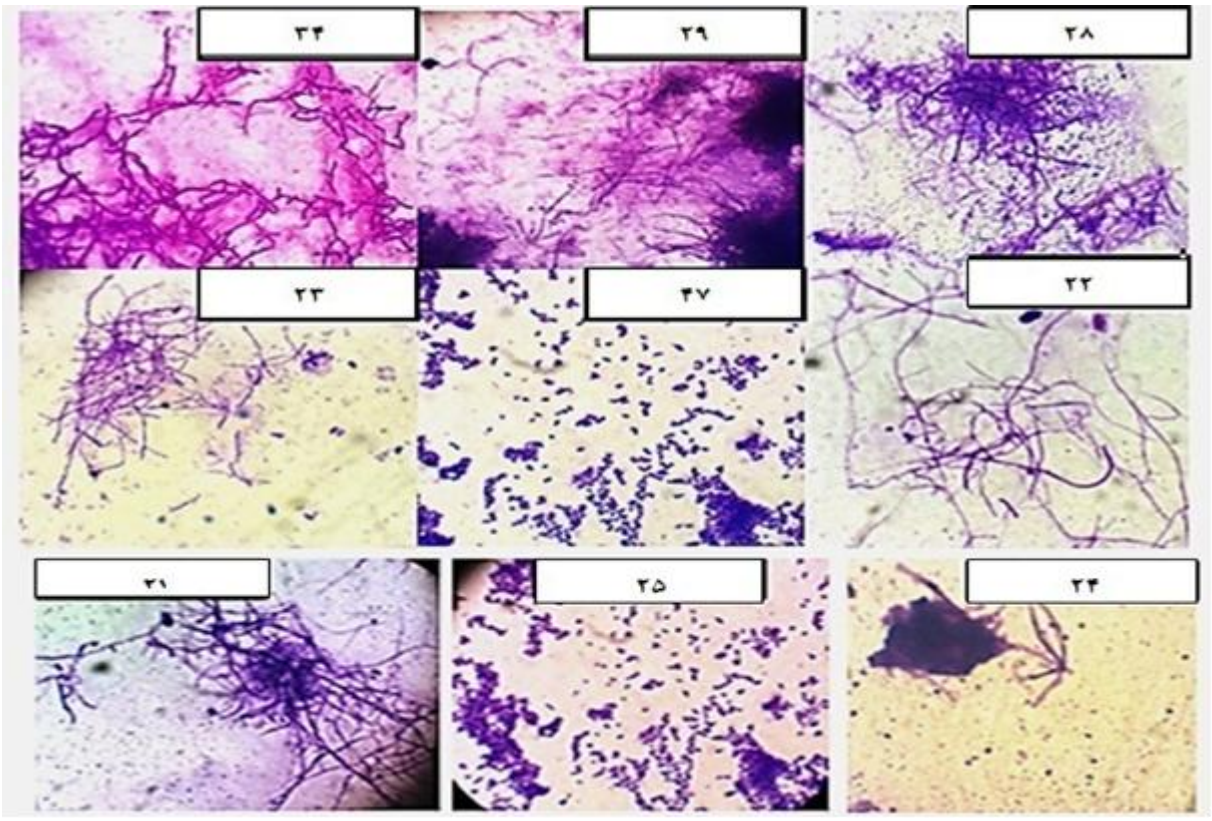
از بین ۵۰ جدایه حاصل، (۹جدایه) ۱۸٪ خاصیت ضد مخمری داشتند. در این میان جدایه ۴۷ با قطر هاله ۳۴ میلی متر بیشترین فعالیت را داشت. این جدایه در کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران با کد UTMC 2325 ذخیره شده است(جدول ۱و شکل ۲). مورفولوژی اکتینومیست‌های دارای فعالیت زیستی در شکل (۳) آورده شده است.

جدول ۱- فعالیت ضد قارچی (*Candida albicans*) اکتینومیست‌های جداشده. فعالیت ضدمیکربی به صورت هاله مهار رشد بر حسب میلیمتر نشان داده شده است.

شماره سویه	فعالیت ضدقارچی	شماره سویه	فعالیت ضدقارچی
۳۴	۴۰	**۲۹**	۲۸
۲۲	۲۶	**۲۸**	۲۶
۲۵	۳۰	**۲۳**	۲۷
۲۱	۲۹	**۴۷**	۳۴
۲۴	۲۹		

شکل ۲- فعالیت ضدقارچی اکتینومیست‌های موثر روی مخمر *Candida albicans* بر محیط PDA.





شکل (۳)- مورفولوژی میکروسکوپی سویه‌های اکتینومایست دارای فعالیت زیستی، بزرگنمایی ×۱۰۰۰

جدایه ۴۷ با کد UTMC 2325، دارای کلنی ریز، برآمده و به رنگ کرم بوده و در مشاهدات میکروسکوپی به صورت باکتری‌های میله‌ای بلند، بدون اسپور و گرم‌مثبت دیده شده است(شکل ۳). ضمناً نتایج آنالیز DPA جدایه UTMC 2325 نشان داد که ایزومر DPA در دیواره سلولی این جدایه *meso* بود. نتیجه توالی خوانی ژن16 SrRNA این اکتینومیست منتخب و بررسی توالی ها در سامانه EZtaxon ، نشان داد که سویه متعلق به جنس *Nocardia* بوده و ۹۸,۸۴ ٪ شباهت به *N. rhamnosiphila* دارد.

بحث

با اینکه بسیاری از ترکیبات ضدقارچ شناسایی شده‌اند اما داروهای ضد قارچ بی‌خطر و موثر به دلیل شباهت بالا بین قارچ‌ها و سلولهای پستانداران، هنوز توسعه نیافته‌اند. بنابراین آمفوتریپسین B که سالها قبل توسعه یافته، برخلاف عوارض جانبی و جدی آن هنوز به طور گسترده در درمان بیماریهای قارچی استفاده می‌شود. داروهای ضدقارچی گروه آزول‌ها عوامل ضدقارچ مانند: میکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و ایتراکونازول در درمان‌های بالینی استفاده می‌شوند. اما این داروها دارای سمیت کلیوی و کبدی بوده و باعث استفراغ و ناتوانی جنسی می‌شود. بنا به دلایل ذکرشده تقاضا برای داروهای ضدقارچی که دارای حداقل اثرات جانبی باشد وجود دارد(۱۵).

جنس نوکاردیا، گروهی دیگر از اکتینومیست های کمیاب است ، زیرا جداسازی این میکروب ها و حفظ آنها در شرایط معمولی مشکل می باشد(۱۶). این جنس در زیر خانواده Nocardiaceae از راسته Corynebacteriales در رده اکتینومیست ها طبقه بندی می شود. این جنس اولین بار توسط Trevisan پیشنهاد شده و به افتخار Edmond Nocard، در سال ۱۸۸۸ نامگذاری شده است. نوکاردیا یک گرم مثبت، هوازی، میله ای با رشته های منشعب است که تا حدودی مقاوم به اسید است. این باکتری ها توانایی قابل ملاحظه‌ای در تولید طیف گسترده ای از ترکیبات فعال زیستی دارند(۱۷ و ۱۸).

از جمله ترکیبات زیستی موجود در نوکاردیا ها می توان نارجنیسین ، نوکاردیسین آ، توبلاکتومیسین آ، براسیلیکاردین آ را نام برد(۱۹). نوکاردیا ها قبلا نیز به عنوان منبع ترکیبات ضد قارچی مورد توجه بوده اند و ترکیبات متعددی از از این باکتری ها گزارش شده است(۱۸ و ۲۲-۲۰). در پژوهش Van Der Sand و همکاران نیز

از بین ۲۵ سویه اکتینومیست جدا شده ۱۱ سویه، فعالیت ضدقارچی علیه *Candida albicans* نشان دادند(۲۳). در پژوهش انجام شده از بین اکتینومیست‌های جدا شده سویه UTMC 2325 دارای فعالیت ضدقارچی علیه *C. albicans* داشته است. این باکتری بیشترین شباهت را به گونه *Nocardia rhamnosiphila* داشته است. گونه *N. rhamnosiphila* در سال ۲۰۱۰ توسط Everest و همکاران جدا شده است. این جدایه قادر به فعالیت آنتی بیوتیکی بر علیه *Escherichia coli* ، *Enterococcus faecium* ، *Mycobacterium aurum* و *Staphylococcus aureus* نشان داده است(۲۴)).

نتیجه گیری

با این وجود توانمندی تولید فراورده‌های ضدقارچی این گونه ارزیابی نشده است. پژوهش کنونی اولین گزارش از فعالیت زیستی نزدیک ترین خویشاوند *N. rhamnosiphila* به آن با شباهت ۹۸/۸۴ درصد شباهت است. پژوهش‌های بیشتری برای تعیین هویت نهایی جدایه *Nocardia sp.* UTMC 2325 به عنوان سویه ارزشمند و منبع ترکیبات ضد مخمری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

مولفین مقاله تشکر و قدردانی خود را از خانم فهمیه محمد نیا و خانم لیلا پرویزی (آزمایشگاه تخصصی زیست شناسی و زیست فناوری اکتینوباکترها، شرکت توسعه فناوری زیستی توکا، تهران، ایران) بابت کمک های فنی و تخصصی اعلام می دارند.

REFERENCES

1. Wright GD. Antibiotics: a new hope. Chemistry & biology. 2012;19(1):3-10.
2. Collier L, Balows A, Sussman MT. Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol. 4. Arnold, London, Sydney, Auckland, New York. 1998.
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance. Journal of medical microbiology. 2006;55(8):999-1008.
4. Patterson T. Treatment and prevention of fungal infections. Focus on candidemia New York: Applied Clinical Education. 2007;23:7-80.
5. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical microbiology reviews. 1998;11(2):382-402.
6. Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. Journal of biotechnology. 2002;99(3):187-98.
7. Kumari KK, Ponmurugan P, Kannan N. Isolation and characterization of Streptomyces sp. from soil samples for secondary metabolite production. Biotechnology. 2006;5(4):478-80.
8. Kaur S, Kaur HP, Kaur G. Isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from agrriculture soil. 2016;5(6): 1109-1117.
9. Shivlata L, Satyanarayana T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations. 2016:8.
10. Nimaichand S, Devi A, Tamreihao K, Ningthoujam D, Li W. Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in Hundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations. 2016:62.
11. Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. Critical reviews in biotechnology. 2012;32(2):108-32.
12. Takizawa M, Colwell RR, Hill RT. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied and environmental microbiology. 1993;59(4):997-1002.

13. Bertani LE, Bertani G. Genetics of P2 and related phages. Advances in genetics. 1971;16:199-237.
14. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in bioinformatics. 2004;5(2):150-63.
15. Kavitha A, Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G. Screening of actinomycetes strains for the production of antifungal metabolites. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(1):027-32.
16. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics. 2005;58(1):1.
17. Tan CK, Lai CC, Lin SH, Liao CH, Chou CH, Hsu HL, et al. Clinical and microbiological characteristics of nocardiosis including those caused by emerging Nocardia species in Taiwan, 1998–2008. Clinical Microbiology and Infection. 2010;16(7):966-72.
18. El-Gendy MM, Hawas UW, Jaspars M. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium Nocardia sp. ALAA 2000. Journal of Antibiotics. 2008;61(6):379.
19. Luo Q, Hiessl S, Steinbüchel A. Functional diversity of Nocardia in metabolism. Environmental microbiology. 2014;16(1):29-48.
20. HOSHINO Y, Mukai A, Yazawa K, Uno J, Ishikawa J, Ando A, et al. Transvalencin A, a Thiazolidine Zinc Complex Antibiotic Produced by a Clinical Isolate of Nocardia transvalensis. The Journal of antibiotics. 2004;57(12):797-802.
21. Tsuda M, Yamakawa M, Oka S, Tanaka Y, Hoshino Y, Mikami Y, et al. Brasilibactin A, a Cytotoxic Compound from Actinomycete Nocardia b rasiliensis. Journal of natural products. 2005;68(3):462-4.
22. Mukai A, Fukai T, Matsumoto Y, Ishikawa J, Hoshino Y, Yazawa K, et al. Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from Nocardia transvalensis IFM 10065. Journal of Antibiotics. 2006;59(6):366.
23. Van Der Sand ST, Spadari C, Antunes TC, Teixeira R, Minotto E, Fuentefria AM. Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. Revista Brasileira de Biociências. 2013;11(4).
24. Everest GJ, Cook AE, le Roes-Hill M, Meyers PR. Nocardia rhamnosiphila sp. nov., isolated from soil. Systematic and applied microbiology. 2011;34(7):508-12.