



Scan online to view this article

## Study of cultivable actinobacterial diversity in Sahoulan Cave and evaluation of their antimicrobial activity

Maghsoud Kafshnouchi<sup>1</sup>, Javad Hamed<sup>2,3\*</sup>

1. Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
2. Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran.

### Abstract

**Aim and Background:** Caves are less studied oligotrophic and dark environments and can be suitable sources for finding promising strains having biotechnological potentials. Sahoulan Cave has a dolomitic structure and is located 42 km southeast of Mahabad city. The aim of the current research was to study the actinobacterial diversity of this cave and evaluate their antimicrobial activity.

**Materials and Methods:** In this project, different samples of soil, water, floor, wall, roof as well as invertebrates of the Sahoulan cave were collected to isolate actinobacteria. To facilitate the isolation, three pretreatments (centrifugation, drying and, microwave) and an antibiotic treatment were performed on the isolates. Then, they were cultured in 10 different isolation media. The isolates were also screened for antimicrobial activity against 10 bacteria and fungi.

**Results:** From 13 samples obtained from the Sahoulan Cave, 8 actinobacteria were isolated from the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Lysinibacter*. *Lysinibacter* sp. UTMC 3606 had 99.3% similarity to *Lysinibacter cavernae*, which was isolated from a cave in China in 2015 as a new species. Of the 8 isolates, 5 isolates had antimicrobial activity, including three *Streptomyces* and two *Micromonospora*. Three isolates were active against *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. One isolate was active against *Escherichia coli* TolC. Antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* UTMC1464 was observed in one strain. Three isolates also showed activity against *Candida albicans* UTMC5055. The isolated *Micromonospora* sp. UTMC3322 showed the highest antimicrobial activity against *S. aureus*, *M. luteus*, and *C. albicans*.

**Conclusion:** Comparison of the obtained results with that of other studies on caves in Iran shows that caves are valuable environments for biodiversity studies and isolation of actinobacteria, however, pristine caves are more preferred. Actinobacterial diversity in the Sahoulan cave was less than Hampoil cave, but the biological activity of the isolates was higher. Study of tourist caves such as the Sahoulan Cave can be a good subject to study the impact of humans and tourism on the biodiversity of caves.

**Keywords:** Actinobacteria, Biodiversity, Sahoulan Cave, Antimicrobial activity, cultivable actinobacteria, Mahabad, Iau Science.

### Corresponding author:

Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Email: [jhamedi@ut.ac.ir](mailto:jhamedi@ut.ac.ir)



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## مطالعه تنوع اکتینوباکترهای قابل کشت در غار سهولان مهاباد و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها مقصود کفشنوچی<sup>۱</sup> و جواد حامدی<sup>۲\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.  
۲. بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.  
۳. مرکز پژوهشی فناوری و فرآورده های میکروبی دانشگاه تهران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** غارها محیط‌های الیگوتروف و تاریکی هستند که کم‌تر مطالعه شده و می‌توانند محیط‌های مناسبی از نظر منبع سویه‌های امیدوارکننده در زیست‌فناوری باشند. غار سهولان یک غار با ساختار دولومیتی در ۴۲ کیلومتری جنوب شرقی شهر مهاباد است. هدف این پژوهش بررسی تنوع اکتینوباکترهای قابل کشت در این غار و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بوده است.

**مواد و روش‌ها:** در این پروژه، نمونه‌های مختلف از خاک، آب، کف، دیوار و سقف غار و هم‌چنین بی مهرگان غار سهولان به منظور جداسازی اکتینوباکترها جمع‌آوری شد. برای تسهیل جداسازی، نمونه‌های جمع‌آوری شده تحت سه پیش تیمار (سانتریفیوژ کردن، خشک کردن و گذاشتن در مایکروویو) و یک تیمار آنتی‌بیوتیکی قرار گرفت و نمونه‌ها در ده محیط جداسازی متفاوت کشت شد. هم‌چنین جدایه‌ها از نظر تولید مواد ضد میکروبی علیه ده باکتری و قارچ غربال شدند.

**یافته‌ها:** از ۱۳ نمونه به‌دست آمده از غار سهولان ۱۸ اکتینوباکتر شامل جنس‌های *Micromonospora*، *Streptomyces* و *Lysinibacter* جدا شدند. سویه ویژه *Lysinibacter* sp. UTMC 3606، ۹۹/۳٪ شباهت به *Lysinibacter cavernae* داشته است که در سال ۲۰۱۵ به‌عنوان گونه جدید از یک غار در چین جدا شده است. از ۸ جدایه به‌دست آمده از ۸ جدایه اکتینوباکتریایی حاصل از غار سهولان هامپوئیل ۵ جدایه دارای فعالیت ضد میکروبی بودند که از این میان ۳ جدایه متعلق به جنس *Streptomyces* و ۲ جدایه متعلق به جنس *Micromonospora* بوده است. ۳ جدایه علیه *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* فعالیت داشتند. یک جدایه علیه *Escherichia coli* TolC فعالیت داشت. فعالیت ضد میکروبی علیه سویه *Bacillus subtilis* UTMC1464 در ۱ جدایه دیده شد. ۳ جدایه نیز فعالیت علیه *Candida albicans* UTMC5055 نشان دادند. جدایه *Micromonospora* sp. UTMC3322 بیش‌ترین فعالیت ضد میکروبی را علیه *C. albicans*، *M. luteus*، *S. aureus* و فعالیت نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** مقایسه نتایج به‌دست آمده با نتایج مطالعه‌های دیگر انجام شده در مورد غارهای ایران نشان می‌دهد که غارها محیط‌های ارزشمندی برای مطالعه‌های تنوع زیستی و جداسازی اکتینوباکترها هستند، ولی غارهای بکر بیش‌تر ترجیح داده می‌شود. تنوع اکتینوباکتریایی در غار سهولان نسبت غار هامپوئیل کم‌تر بوده، ولی فعالیت زیستی جدایه‌ها بیش‌تر بوده است. مطالعه بر غارهای توریستی مانند غار سهولان می‌تواند موضوع مناسبی برای بررسی تأثیر انسان و توریسم بر تنوع زیستی غارها باشد.

**واژگان کلیدی:** اکتینوباکترها، تنوع زیستی، غار سهولان، فعالیت ضد میکروبی، اکتینوباکترهای قابل کشت، مهاباد، Iau Science.

### مقدمه

اکتینوباکترها منبع بسیار مهمی از ترکیب‌های زیستی ارزشمند هستند و بسیاری از داروهای تجاری توسط

نویسنده مسئول:

بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران  
پست الکترونیکی: jhamedi@ut.ac.ir  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

ویروس‌ها و قارچ‌ها در غارها یافت می‌شوند. غارها می‌توانند هم چنین منابع میکروارگانیسم‌ها و مولکول‌های جدید مثل آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها باشند که ممکن است برای اهداف بیوتکنولوژیک مناسب باشند (۱۴).

میکروارگانیسم‌های غاری به لحاظ متابولیک متنوع هستند و می‌توانند انرژی را به‌طور مستقل از طریق فعالیت‌های نوری-شیمیایی اتوتروفی یا از طریق فعالیت‌های هتروتروفی به‌دست بیاورند. گروه‌های میکروبی مختلف در شکل‌گیری ویژگی‌های غاری و چرخه‌های بیوژئوشیمیایی شرکت دارند. درک این میانکنش‌ها (تنوع و فعالیت میکروبی) برای حفظ اکوسیستم‌های میکروبی به‌ویژه آن‌هایی که ارزش علمی، هنری، توریستی دارند، مهم است (۱۵).

هدف پژوهش کنونی بررسی تنوع اکتینوباکتری‌های غار سهولان در روستای سهولان است. این غار در ۴۲ کیلومتری جنوب شرقی شهر مهاباد و در ۲۵ کیلومتری شهر بوکان در استان آذربایجان غربی قرار دارد. ارتفاع سقف غار تا سطح دریاچه آن به ۵۰ متر و عمق آب در برخی جاها به ۳۰ متر می‌رسد. در این غار آثار زندگی انسانی هزاره دوم قبل از میلاد به‌دست آمده و در طول تاریخ از آن به‌عنوان پناهگاه و محلی برای شکار استفاده شده است. این غار در درون سنگ‌های آهکی و دولومیتی پریمین با ضخامتی حدود ۳۰۰ متر و با فراوانی متوسط از درز و شکاف و سطوح لایه‌بندی با شیبی بین ۵۳ تا ۵۵ درجه به سمت جنوب غرب تشکیل شده است (۱۶). غار دارای دو مسیر آبی و خشکی است. طول مسیر آبی ۳۰۰ متر و طول مسیر خشکی ۲۵۰ متر و مساحت غار حدود ۲ هکتار است. البته برخی معتقد هستند که مساحت اصلی غار بیش از این مقدار است و این مقدار، مساحت کشف شده غار سهولان است. میانگین ژرفای آب ۲۲ متر و بیشینه ژرفای آب ۶۲ متر است. میزان رطوبت در غار ۷۰٪ الی ۷۵٪ و دمای درون غار در طول سال بین ۵ الی ۱۰ درجه سلسیوس است. ارتفاع غار از سطح دریا‌های آزاد ۱۷۵۱ متر و موقعیت جغرافیائی آن ۴۶ درجه شرقی و ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه عرض شمالی است. این غار به‌علت کوچکی و نیز سهولت رفت و آمد به آن و نیز تغییرهای انجام شده برای پذیرش گردشگران، از جمله نصب چراغ-های برقی از نظر اکولوژیکی با شرایط غارهای طبیعی بسیار متفاوت است (۱۶). به‌عنوان مثال وجود نور سبب رشد فراوان جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها شده است که در شرایط طبیعی در غارها یافت نمی‌شوند. با این وجود گزارشی از وضعیت تنوع زیستی این غار منتشر نشده

اعضای این گروه تولید شده است. کشف گونه‌های جدید از اکتینوباکتری‌ها، به‌ویژه اکتینوباکتری‌های نادر راه‌کار خوبی برای معرفی ترکیب‌های بیوشیمیایی ارزشمند مورد استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت است (۱). اکتینوباکتری‌های گرم مثبت با درصد GC بالا هستند که به‌صورت آزادی، هم‌زیست با گیاهان و حیوانات و یا به‌صورت پاتوژن آن‌ها یافت می‌شوند (۲). ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که اکتینوباکتری منبع تولید یک سوم از محصول‌های بیوتکنولوژی میکروبی هستند (۳). این باکتری‌ها از محیط‌های مختلف خاکی و آبی از جمله غارها جدا شده‌اند. ویژگی اولیگوتروف بودن غارها می‌تواند منجر به هم‌زیستی طیف گسترده‌ای از گونه‌ها و هم-چنین تحریک روش‌های بی‌نظیر در میکروبیوم‌های بومی جهت تولید محصولات بیوتکنولوژی مختلف شود (۴).

اگر چه طی حدود دو دهه فعالیت در آزمایشگاه زیست فناوری میکروبی دانشگاه تهران، دستاوردهای متعددی در مورد اکتینوباکتری‌ها به‌دست آمده و تاکسون‌های جدید متعددی شامل گونه‌های *Streptomyces iranensis* (۵)، *Nocardioopsis arvandica* (۶)، *Nocardioopsis sinuspersici* (۷)، *Promicromonospora iranensis* (۸)، *Streptomyces zagrosensis* (۹)، *Promicromonospora kermanensis* (۱۰) و *Kribbella shiranzensis* (۱۱) و *Saccharothrix ecbatanensis* (۱۲) از کشور گزارش شده است. با این وجود اغلب فعالیت‌های فوق در مورد اکتینوباکتری‌های ایران بر روی نمونه‌های آبی و خاکی انجام شده است و تاکنون فقط یک گزارش در مورد اکتینوباکتری‌های محیط غار هامپوئیل از کشور منتشر شده است (۱۳).

غارها می‌توانند به لحاظ مواد غذایی الیگوتروف (دارای مواد غذایی محدود) باشند یا به‌طور طبیعی سرشار از برخی مواد خاص باشند. بنابراین غارهای مختلف می‌توانند زیست‌گاه گروه‌های مختلف از میکروارگانیسم‌ها باشند که در نیچ‌های اکولوژیکی مختلف در کنار سایر موجودات غارزی و فاکتورهای محیطی از جمله دی‌اکسید کربن، دما و محتوی مواد آلی ساکن شده و فعالیت‌های زیستی غارها از جمله شکل‌گیری، تغییر ساختارهای غاری و چرخه مواد غذایی را تعیین می‌کنند. میکروارگانیسم‌هایی که در غار یافت می‌شوند می‌توانند بومی غار باشند یا توسط انسان‌ها، حیوانات، جریان آب یا عملکرد باد به درون غار وارد شده باشند، بنابراین غارهای مختلف گروه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها را دارند. گروه‌های متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، آرکی‌ها،

است.

## مواد و روش کار

### نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها

تعداد ۱۳ نمونه خاک، آب و حشرات زنده و مرده از قسمت های مختلف دیواره، سقف و کف غار سهولان جمع آوری شد (جدول ۱).

با در نظر گرفتن تنوع فراوان اکتینوباکترهای نوین در ایران و ویژگی های ناشناخته غار سهولان به عنوان یک محیط الیگوتروف، در این پژوهش تنوع زیستی اکتینوباکترهای قابل کشت و فعالیت ها ضد میکروبی این جدایه ها بررسی شده است.

جدول ۱. مشخصات محل نمونه برداری و ویژگی نمونه های غار سهولان

شماره نمونه	محل نمونه برداری	ویژگی نمونه و کد رنگ
۱	لجن ورودی الف (بخش خشکی) سمت راست	سبز قهوه ای لجنی- Ral 6020
۲	آب ورودی الف (بخش خشکی) سمت راست	شفاف و بیرنگ
۳	آب چکیده از سقف بخش حوضچه مرکزی- (استالاکتیت کوچک)	شفاف و بیرنگ
۴	آب چکیده از سقف- بخش مرکزی (استالاکتیت بزرگ)	شفاف و بیرنگ
۵	آب حوضچه بزرگ	شفاف و بیرنگ
۶	لجن حوضچه بزرگ	خردلی ماسه ای- Ral 1005
۷	حشره	شفاف
۸	سخت پوست	شفاف
۹	زالو	شفاف
۱۰	پوشش سطحی غار به طرف ورودی الف	قهوه ای تیره و روشن- Ral 8014
۱۱	پوشش جلبکی/اسیانوباکتر از حوضچه اصلی	طوسی گل بهی با بافت نرم و ریز- Ral 1019
۱۲	آب بخش عمیق ۶۲ متری	شفاف و بیرنگ
۱۳	خاک حاشیه بخش عمیق ۶۲ متری	سبز قهوه ای لجنی- Ral 6020

جهت کاهش رشد کپک ها و سایر میکروارگانیسم های فراوان موجود در خاک، سه پیش تیمار خشک کردن، مایکروویو و سانتریفیوژ روی نمونه های خاک و یک تیمار افزودن آنتی بیوتیک بر روی محیط کشت انجام گرفت (۶). به منظور خشک کردن نمونه های خاک، ۵ گرم از نمونه های خاک به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به منظور پیش تیمار مایکروویو، ۵ گرم از نمونه ها به مدت سه دقیقه در مایکروویو (شرکت سامسونگ، کره جنوبی) قرار گرفت. سپس ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل به نمونه های خاک تیمار شده اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰ rpm هم زده شد. به منظور پیش تیمار سانتریفیوژ، ۵ گرم از هر نمونه خاک به ۴۵ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰ rpm هم زده شد. نمونه ها به تیوب فالكون ۵۰ استریل منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه

نمونه ها در شرایط مناسب درون پلاستیک های زیپ دار و درون بطری های پلاستیکی در کوتاه ترین زمان به آزمایشگاه منتقل و تا زمان کشت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه های آب بدون هیچ پیش تیمار و تیماری مستقیم، در محیط های جداسازی کشت داده شدند. ولی نمونه های خاک و حشره به شرح زیر آماده سازی شدند.

برای آماده سازی نمونه های خاک، این نمونه ها در پلیت های شیشه ای استریل ریخته شده و به مدت یک روز در آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به منظور خشک شدن قرار گرفت (۱۷). هم چنین به منظور جهت آزاد شدن اسپورهای اکتینوباکترهای متصل به ذرات خاک، نمونه ها در هاون کوبیده شده و سپس از الک با قطر منفذ یک میلی متر عبور داده شد.

## شناسایی مولکولی سویه‌ها

برای شناسایی مولکولی، ابتدا بیوماس باکتری‌ها با کشت در ۲۰ میلی لیتر محیط BHI برات در فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری، گرماگذاری به مدت ۴-۵ روز در شیکر انکوباتور (شرکت ویژن ساینتیفیک، کره جنوبی) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه به دست آمد. با محلول نرمال سالین شسته و دوباره سانتریفیوژ شد. به منظور استخراج DNA، رسوب بیوماس به دست آمده به کمک نیتروژن مایع و هاون چینی کوبیده، در ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برای استخراج DNA به کمک کیت استخراج DNA شرکت پویا ژن آزما به کار برده شد. تأیید بررسی کیفیت استخراج DNA با الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE 1X انجام شد. بیوماس حاصل با پرایمرهای 9F و 1541R به شرح زیر (۲۰) و با کیت PCR شرکت پویا ژن آزما تکثیر شد.

9F: 5'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT  
(Tm: ۵۶CAG -3')

1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC  
(Tm: ۵۶A -3')

با استفاده از این پرایمرها ژن 16S rRNA به طول حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید تکثیر شد. واکنش PCR طبق روش استاندارد انجام گرفت (شرکت بیوئر، چین). دناتور شدن اولیه در دمای ۹۶ °C و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. ۳۰ چرخه تکثیر شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ °C، ۵۵ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سلسیوس و ۷۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل ۱۰ دقیقه دما در ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل نهایی سنتز DNA نگه داشته شد. اطمینان از تکثیر ژن با بررسی محصول‌های PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه الکتروفورز (شرکت فناوران اختریان، ایران) انجام شد. خالص‌سازی محصول PCR به کمک کیت تخلیص و توسط شرکت توپاز ژن (کرج، ایران) انجام شد. تعیین توالی نیز از طریق خدمات شرکت فوق و توسط شرکت میکروسینس (سوئیس) انجام شد.

برای ارزیابی کیفیت توالی‌های حاصل از برنامه Chromas و برای ادغام و تکمیل توالی‌های حاصل از پرایمر از برنامه Clustal استفاده شد. بررسی میزان مشابهت ترادف‌های حاصل با ترادف‌های گونه‌های تایپ شناخته شده با استفاده از سامانه EzBioCloud انجام شد (۲۱).

با دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جهت کشت مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور حذف میکروارگانیسم‌های سطحی نمونه‌های حشرات ابتدا در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه غوطه‌ور شد. سپس توسط هموژنایزر استریل با ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی همگن شده و در نهایت در محیط‌های جداسازی کشت داده شد (۱۸).

## محیط‌های کشت جهت جداسازی اولیه

به منظور جداسازی اولیه اکتینوباکترها، هشت نوع محیط کشت تهیه گردید. محیط‌ها شامل هیکی ترزسر آگار (Hickey Tresner agar)، عصاره خاک آگار (Soil extract agar)، کمیوست آگار (Compost agar)، سبوس برنج آگار (Rice bran agar)، اکتینوماست آگار (Actinomycete Agar)، نشاسته کازئین نیترات آگار (Starch casein nitrate agar)، محیط کشت ۲ پروژه بین المللی استریتومایسس (International Streptomyces Project-ISP2) و نوترینت آگار (Nutrient Agar) بودند. ترکیب‌های هشت محیط کشت استفاده شده در جدول (۲) آورده شده است. محیط‌های SEA, SCNA, ISP2, NA برای جداسازی اکتینوماست‌های بارز و HTA, CA, RBA برای اکتینوماست‌های نادر مناسب‌تر هستند. این محیط‌های کشت به دو صورت بدون آنتی‌بیوتیک و نیز دارای آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (جابر ابن حیان، تهران، ایران) به مقدار ۵۰ µg/ml استفاده شد (۱۹).

نمونه‌های آب، خاک و حشرات بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت فوق تلقیح و به مدت ۱۰-۱۴ روز در دمای ۲۸ °C گرماگذاری شد.

## بررسی رشد و مورفولوژی

میزان رشد سویه‌ها، رنگ میسلیم زمینی، رنگ میسلیم هوایی، تشکیل اسپور و رنگ آن و تولید پیگمان محلول در آب در محیط (ISP2) با استفاده از کاتالوگ رنگ استاندارد RAL مورد بررسی قرار گرفت [https://www.dsmz.de/Bacterial\\_Nomenclature\\_\(uptodate/Actinomethods.pdf\)](https://www.dsmz.de/Bacterial_Nomenclature_(uptodate/Actinomethods.pdf)).

## نگهداری جدایه‌ها

جدایه‌ها در محیط ISP2 و ۲۰٪ گلیسرول همگن شده و در کرایوتیوب‌های ۲ میلی لیتری در دمای -۷۶ و -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جدول ۲. اجزا محیط کشت و مقدار آن‌ها در محیط کشت‌های استفاده شده.

Hickey Tresner agar (HTA)	(g/L)	Soil extract agar (SEA)	(g/L)
Dextrin (Merck, Germany)	۱۰	Soil (Iran)	۴
Yeast extract (Ibresco, Iran)	۱	Yeast extract (Ibresco, Iran)	۱
Beef extract (Difco, USA)	۱	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۵
Calcium chloride (Merck, Germany)	۰/۰۲	KCl (Merck, Germany)	۱/۷
N-Z-Amine (Difco, USA)	۲	MgSO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۵
Agar (Ibresco)	۱۵	CaCO <sub>3</sub> (Merck, Germany)	۰/۲
pH 9		Agar (Ibresco, Iran)	۱۵
		pH 7	
Compost agar (CA)	(g/L)	Rice bran agar (RBA)	(g/L)
Compost (Gilda, Iran)	۱۰	Rice bran powder (Iran)	۲۰
Yeast extract (Ibresco, Iran)	۱	Yeast extract (Ibresco, Iran)	۱
Agar (Ibresco, Iran)	۱۵	Agar (Ibresco, Iran)	۱۵
pH 7.4		pH 7.4	
Actinomycete Agar (AA)	(g/L)	Starch casein nitrate agar (SCNA)	(g/L)
Sodium caseinate (Merck, Germany)	۲	Soluble starch (Merck, Germany)	۱۰
L-arginine (Merck, Germany)	۰/۱	Casein vitamin free (Merck, Germany)	۰/۱
Sodium propionate (Merck, Germany)	۴	Sodium nitrate (Merck, Germany)	۲
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۵	Sodium chloride (Ibresco)	۲
MgSO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۱	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۲
FeSO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۰۰۱	MgSO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۰۵
Glycerol (Merck, Germany)	۵	CaCO <sub>3</sub> (Merck, Germany)	۰/۰۲
Agar (Ibresco, Iran)	۱۵	FeSO <sub>4</sub> (Merck, Germany)	۰/۰۱
pH 8		Agar (Ibresco, Iran)	۱۵
		pH 8	
International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2)	(g/L)	Nutrient Agar (NA)	(g/L)
Malt extract (Merck, Germany)	۱۰	Meat extract (Merck, Germany)	۱
Yeast extract (Ibresco, Iran)	۴	Meat peptone (Ibresco, Iran)	۵
Glucose (Ibresco, Iran)	۴	Sodium chloride (Ibresco, Iran)	۵
Calcium carbonate (Merck, Germany)	۲	Yeast extract (Ibresco, Iran)	۲
Agar (Ibresco, Iran)	۱۵	Agar (Ibresco, Iran)	۱۵
pH 7.2		pH 7	

کره جنوبی) با دور ۲۲۰ rpm گرماگذاری تهیه شد. از پیش کشت تهیه شده در محیط ISP2 برات با حجم بیش‌تر تلقیح و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۲۰۰ rpm به مدت ۷ روز گرماگذاری شد.

### بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها

ابتدا پیش کشت از هر سویه با تلقیح در محیط کشت ISP2 برات، گرماگذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور (ویژن ساینتیفیک،

مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. تعداد باکتری در سوسپانسیون تلقیحی به محیط کشت مولر هینتون آگار در غلظت  $10^8 \times 1/5$  با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد.

(۲۲). مایع تخمیر به مدت ۱۰ دقیقه و  $4000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای سنجش میزان تولید ماده ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

سویه های مورد سنجش (جدول ۳) بر روی محیط

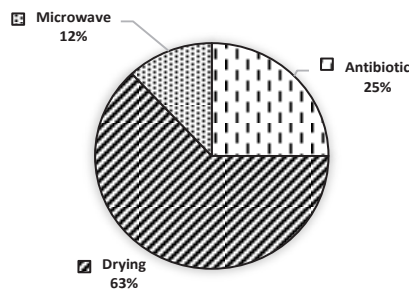
جدول ۳. سویه های حساس مورد استفاده برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه های اکتینوباکتر

نام سویه	کد UTMC
<i>Micrococcus luteus</i>	1461
<i>Escherichia coli</i> ToIC	1462
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1463
<i>Bacillus subtilis</i>	1464
<i>Escherichia coli</i>	1465
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1466
<i>Staphylococcus aureus</i>	1467
<i>Candida albicans</i>	5055
<i>Pichia anomala</i>	5056
<i>Mucor hiemalis</i>	5057

## نتایج

این پژوهش با هدف بررسی فراوانی اکتینوباکترهای غار سهولان انجام شده است. مشخصات محل های نمونه برداری، ویژگی های نمونه ها در جدول (۱) آورده شده است. از ۱۳ نمونه جمع آوری شده از غار سهولان، پس از حذف نمونه های تکراری و نمونه های غیر از اکتینوباکتر، به طور جمع ۸ جدایه اکتینوباکتر به دست آمده است. فراوانی این جدایه ها در شرایط مختلف در شکل (۱) نشان داده شده است.

مقدار  $100 \mu\text{l}$  از سویه های حساس با غلظت نیم مک-فارلند روی محیط پلیت مولر هینتون آگار قرار داده شد و با سوآب استریل به صورت یکنواخت در سرتاسر گسترانیده شد. از مایع رویی کشت سویه مورد نظر  $100 \mu\text{l}$  در چاهک های به قطر  $10 \text{ mm}$  ایجاد شده در پلیت تلقیح شد. پلیت ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس و سپس در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوباسیون شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان هاله عدم رشد توسط کولیس با دقت  $0/1 \text{ mm} \pm$  اندازه گیری شد.



شکل ۱. تأثیر تیمار آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و پیش تیمارهای خشک کردن و مایکروویو بر درصد اکتینوباکترهای جدا شده از غار سهولان

های دیگر شامل محیط های SCA, AA, HT, NA و SEA محیط مناسبی در مقایسه با سایر محیط ها نبوده است.

تعداد سویه های جدا شده بر روی هر محیط بیشترین جدایه از محیط کمپوست آگار (CA) و محیط سبوس برنج آگار (RA) جدا شده است. پس از آن محیط ISP2 محیط برتر با رتبه دوم بوده است. بر روی محیط-

## تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های اکتینوباکتر

تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی اکتینوباکترهای جدا شده از غار سهولان در شکل (۳) آورده شده است.

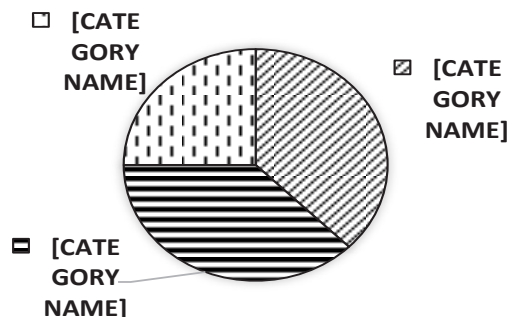
### شناسایی مولکولی جدایه‌ها

نتیجه تکثیر محصول PCR ژن 16S rRNA و آنالیز نتایج حاصل و مقایسه تعیین توالی آنها با سویه های تایپ نشان داد که جدایه‌ها به ۴ جنس مختلف *Streptomyces*، *Micromonospora*، *Kocuria* و *Lysinibacter* تعلق داشتند (جدول ۴). دو جدایه که هر دو متعلق به گونه *Streptomyces albidoflavus* بود؛ شباهت ۱۰۰٪ با نزدیک‌ترین سویه خویشاوند خود داشتند، ۶ جدایه دیگر حدود ۹۹٪ با نزدیک‌ترین گونه خود مشابهت نشان دادند.

### فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها

از ۸ جدایه اکتینوباکتریایی حاصل از غار سهولان هامپوئیل ۵ جدایه دارای فعالیت ضد میکروبی بودند. ۳

جدایه علیه *Staphylococcus aureus* UTMC1467 و *Micrococcus luteus* UTMC1461 فعالیت داشتند. یک جدایه علیه *Escherichia coli* TolC UTMC1462 فعالیت داشت. فعالیت ضد میکروبی علیه سویه *Bacillus subtilis* UTMC1464 در ۱ سویه دیده شد. ۳ جدایه نیز فعالیت علیه *Candida albicans* UTMC5055 نشان دادند. جدایه *Micromonospora* sp. UTMC3322 بیش‌ترین فعالیت ضد میکروبی علیه سه سویه را نشان داد. هیچ‌یک از سویه‌ها فعالیتی علیه *Pseudomonas aeruginosa* UTMC1463، *Escherichia coli* UTMC1465، *Chromobacterium violaceum* UTMC1466، *Mucor hiemalis* و *Pichia anomala* UTMC5055 دیده نشد.



شکل ۲. درصد اکتینوباکترهای جدا شده بر روی محیط‌های جداسازی مورد استفاده (SEA<sup>۴</sup> و SCA، NA<sup>۳</sup>، RA، CA، ISP<sub>۲</sub>، AA<sup>۱</sup>، HT<sup>۲</sup>) از غار سهولان.

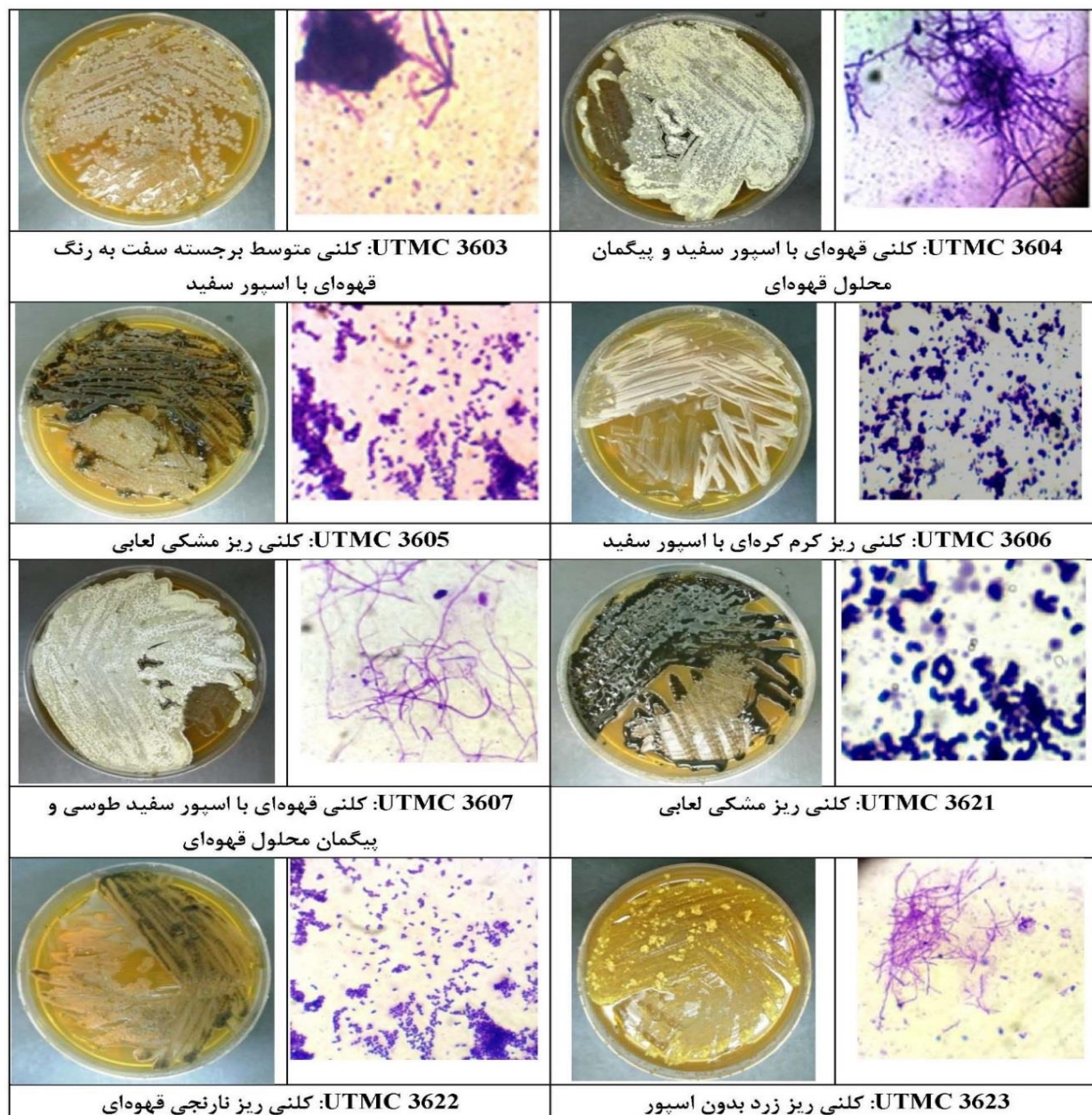
<sup>۱</sup> Actinomycete Agar

<sup>۲</sup> Hickey Tresner agar

<sup>۳</sup> Nutrient Agar

<sup>۴</sup> Soil extract agar





شکل ۳. تصویر کلنی و میکروسکوپی نوری (×۱۰۰۰) جدایه‌های اکتینوباکتر جدا شده از غار سهولان بر روی پلیت ISP2 آگار.

جدول ۴. طبقه‌بندی جدایه‌های اکتینوباکتر جدا شده از غار سهولان بر اساس میزان شباهت ژن 16SrRNA

کد UTMC	نزدیکترین سویه شناسایی شده با بیشترین تشابه	درصد شباهت	کد نمونه	محیط کشت جداسازی
۳۶۰۳	<i>Streptomyces qinglanensis</i>	۹۹/۱۴	۶	CA
۳۶۰۴	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	۱۰۰	۱	RBA
۳۶۰۵	<i>Micromonospora chalcea</i>	۹۹/۷۵	۶	CA
۳۶۰۶	<i>Lysinibacter cavernae</i>	۹۹/۳۰	۸	RBA
۳۶۰۷	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	۱۰۰	۶	RBA
۳۶۲۱	<i>Micromonospora chalcea</i>	۹۹/۶۹	۱۰	ISP2
۳۶۲۲	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	۹۹/۸۰	۱۰	ISP2
۳۶۲۳	<i>Kocuria rhizophila</i>	۹۹/۸۸	۷	CA

## بحث

در سال‌های اخیر به محیط‌های کم‌تر شناخته شده و دارای شرایط زیستی سخت<sup>۱</sup> مانند دریاها و بیابان‌ها به- عنوان منابع جدید ذخایر ژنتیکی توجه شده است (۲۳). غارها با مقادیر محدود مواد غذایی، دمای ثابت و پایین، رطوبت بالا و غلظت‌های بالای مواد معدنی می‌توانند به- عنوان محیط‌های سخت برای حیات در نظر گرفته شوند و زیستگاه‌های اکولوژیکی خاصی را برای میکروارگانیسم‌های به‌شدت اختصاصی شده فراهم کنند (۲۴). رطوبت بالا و دمای ثابت از جمله صفات پایدار غار در طول سال است. تاریکی کامل و فقدان فتوسنتز در نواحی تاریک غار سبب محدودیت مواد غذایی و محدودیت حیات شده و در این محیط‌ها اشکال محدودی از زندگی وابسته به منابع حداقل انرژی (توسط باد یا آب‌های چکنده از سقف و دیوارهای غار) یا فعالیت‌های شیمیواتولیتوتروفی (اکسیداسیون گوگرد یا آمونیوم) وجود دارد (۲۵). آب ورودی، بازدیدکننده‌ها و حیوانات می‌توانند ورود مواد آلی را به درون غار فراهم کنند و حیات را برای میکروارگانیسم‌های هتروتروف در برخی غارها تسهیل کنند.

بررسی تنوع زیستی باکتری‌ها در غارهای طبیعی حضور بارز اکتینوباکترها را نشان داده است (۲۶). دو جنس *Nocardia spelunca*، *Nocardia jejuensis* در مطالعه‌های اخیر از غارهای طبیعی کره جنوبی جدا شده است. به‌طور تقریبی ۳۵۰ اکتینوباکتر با روش‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و کموناکسونومیکي در غارها شناسایی شده است (۲۷). اکتینوباکترها فراوان‌ترین جدایه‌ها از جمعیت باکتریایی غارهای پاسارجویا جاما<sup>۲</sup> (۲۸)، آلتامیرا<sup>۳</sup> (۲۹) و تیتوبوستیلو<sup>۴</sup> (۳۰) بوده‌اند. نیمی از اکتینوباکترهای غار کارلزباد کاورن را جنس *Pseudonocardia* تشکیل می‌دهد. از سنگ‌های غار گروتادل فیوم<sup>۵</sup> اکتینوباکترهای جنس *Acidimicrobium* جدا شده است. این باکتری‌ها، هتروتروف‌های اکسید کننده سولفور هستند که به‌طور غالب با شرایط محیطی به‌شدت اسیدی سازگار هستند (۳۱). در تجمع‌های سفید رنگ غار آلتامیرا، اکتینوباکترها یکی از بزرگترین گروه‌های باکتریایی شامل جنس‌های *Pseudonocardia*، *Corynebacterium*، *Propionibacterium*

*Frankia* و *Gordonia* بوده است (۳۲). یک اکتینوباکتر جدید از غار آلتامیرا جداسازی شده و *Nocardia altamirensis* نام‌گذاری شده است (۳۳). بیوفیلیم اکتینوباکترهای غار بتز<sup>۶</sup> شامل جنس‌های *Arthrobacter*، *Curtobacterium*، *Nocardia*، *Rhodococcus*، *Promicromonospora*، *Blastococcus*، *Blastococcus*، *Micrococcus*، *Streptomyces* و *Kribbella* بوده است (۳۴). گونه‌های قابل کشت اکتینوباکترها از کریستال‌ها و دیواره کریستالی غار چیپوهاوا<sup>۷</sup> واقع در مکزیک با دمای ثابت ۵۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰۰٪ جدا شده‌اند. همه جدایه‌ها به طور نزدیکی مرتبط با جنس *Prauserella* متعلق به خانواده *Pseudonocardiaceae* بودند (۳۵).

تاکنون فقط دو پژوهش بر روی اکتینوباکترهای موجود در غارهای ایران منتشر شده که هر دو بر غار هامپوئیل انجام شده است (۱۳، ۳۶)، ولی روش جداسازی و غنی- سازی در این دو پژوهش متفاوت بوده و به نتایج متفاوتی نیز منجر شده است. نتایج پژوهش منتشر شده در سال ۲۰۱۹ توسط Hamedi و همکاران (۱۳) را بهتر می‌توان با پژوهش کنونی مقایسه کرد زیرا روش جداسازی و غربالگری در هر دو پژوهش یکسان بوده است. در پژوهش Hamedi و همکاران (۱۳) از ۳۳ نمونه جمع‌آوری شده از غار هامپوئیل ۷۶ اکتینوباکتر شامل جنس‌های *Micrococcus*، *Micromonospora*، *Streptomyces* و *Kocuria* جدا شده است (۱۳). ولی در پژوهش انجام شده در سال ۲۰۲۱ توسط Almasi و همکاران (۳۶) بر این غار محیط‌های کشت در خاک غار و به کمک ابزار خاصی مدفون (*in situ* cultivation) شده است. نمونه‌ها پس از ۳ ماه از خاک خارج شده و سویه‌های رشد کرده بر سطح محیط کشت جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شده است. این جدایه‌ها با جدایه‌ها پیشین به‌دست آمده از غار هامپوئیل (۱۳) متفاوت بوده است، در پژوهش Almasi و همکاران (۳۶) به روش *in situ* cultivation، ۱۵ جدایه اکتینوباکتریایی به‌دست آمده که متعلق به جنس‌های *Streptomyces*، *Kribbella*، *Micromonospora* و *Oerskovia* بوده است. تفاوت این نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت محیط‌های کشت به کار رفته و نیز نوع روش جداسازی *in situ* و *ex situ* باشد.

- 1 - Extreme
- 2 - Pajsarjeva jama
- 3 - Altamira
- 4 - Tito Bustillo
- 5 - Grotta del Fium

- 6 - Bats
- 7 - Chihuahua

فعالیت ضد میکروبی بوده است.

اگرچه تعداد نمونه‌های جدا شده از غار سهولان به نسبت نمونه‌های غار هامپوئیل بسیار کم بوده، ولی در هر دو غار تعداد اکتینوباکترها در نمونه‌های غنی از مواد غذایی بیش از نمونه‌های غیر غنی شده الیگوتروف بوده است. نتیجه مشابهی در مطالعه‌های پیشین نیز دیده شده است (۳۹). در هر صورت همان‌گونه که گفت روش غنی‌سازی و جداسازی به کار رفته در هر پژوهش می‌تواند تأثیر زیادی در سویه‌های به دست آمده داشته باشد.

فعالیت ضد میکروبی در حدود ۶۲٪ از جدایه‌های غار سهولان دیده شده، ولی حدود ۲۵٪ از جدایه‌های غار هامپوئیل فعالیت ضد میکروبی داشته‌اند. اگر چه تعداد نمونه‌های غار سهولان کم بوده و به سختی می‌توان از نظر آماری به آن تکیه کرد، در ضمن با توجه به رفت و آمد فراوان گردشگران در این غار، امکان آلوده شدن محیط غار به سویه‌های میکروبی خارج از غار وجود دارد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش و دیگر مطالعه‌های انجام شده در غارهای ایران می‌توان گفت این غارها محیط‌های ارزشمندی برای مطالعه‌های تنوع زیستی و جداسازی اکتینوباکترها هستند. ولی غارهای دست نخورده و بکر بیش‌تر ترجیح داده می‌شود. در ضمن غارهای توریستی می‌توانند موضوع مناسبی برای بررسی تأثیر انسان و توریسم بر تنوع زیستی غارها باشد.

با مقایسه نتایج پژوهش کنونی با پژوهش Hamedi و همکاران (۱۳) که روش پژوهش یکسانی را به کار برده‌اند، می‌توان گفت علت تفاوت نتایج مشاهده شده بین دو پژوهش می‌تواند ناشی از ساختار دو غار باشد. غار سهولان از جمله غارهای کربناتی (۱۶) است، که از جمله فراوان‌ترین انواع غارها است. این غارها از انحلال سنگ‌هایی مثل سنگ آهک و دولومیت در طول میلیون‌ها سال ایجاد شده‌اند (۳۷). غار سهولان ساختار خاصی دارد که شرایط مطالعه آن را به طور کلی با غار هامپوئیل متفاوت کرده است. در مورد غار هامپوئیل وجود یک پرتگاه حدود ۲۰ متری در ورودی بخش تاریک و نیز تاریکی حاکم بر این بخش سبب شده تا انسان‌های محدودی در این بخش‌ها آمد و شد داشته باشند. ولی در مورد غار سهولان وضعیت به طور کامل متفاوتی دیده می‌شود. ورودی غار سهولان هم سطح زمین قرار داشته و در آن دو مسیر خشکی و آبی ساخته شده است. در مسیر خشکی پله‌های بتونی و در مسیر آبی قایق‌های کرایه‌ای، سبب تسهیل آمد و شد بازدیدکنندگان غار می‌شوند. در ضمن این دو مسیر آبی و خاکی در وسط غار به هم می‌رسند. وجود گردشگران و آلودگی‌های ناشی از حضور آن‌ها، سبب شده تا غار سهولان برای مطالعه تنوع زیستی چندان مناسب نباشد، زیرا وجود نور مصنوعی سبب شده تا بر خلاف غارهای تاریک که شیمیولیتوتروف‌ها و هتروتروف‌ها بخش‌های اصلی زنجیره غذایی را تشکیل می‌دهند، موجودات فتوتروف شامل سیانوباکترها و جلبک‌ها پوشش سبز رنگ و ضخیمی را در بخش‌های مختلف غار سهولان تشکیل دهند و این کار سبب شده تا توالی اکولوژیک طبیعی غار بر هم خورده و تنوع زیستی متفاوتی به نسبت غار هامپوئیل دیده شود. تنوع زیستی غار هامپوئیل بسیار بیش‌تر از غار سهولان بوده و در بین جدایه‌های حاصل از غار هامپوئیل علاوه بر اعضای جنس *Streptomyces*، *Micromonospora* و *Kocuria* که در هر دو غار یافت شده، سویه‌های متعلق به جنس‌های *Micrococcus* و *Corynebacterium* نیز گزارش شده است (۱۳). اگر چه در بین جدایه‌های غار سهولان سویه *Lysinibacter sp.* UTMC 3606 با ۹۹/۳٪ شباهت به *Lysinibacter cavernae*، یافت شده که در قبل از غار هامپوئیل جدا نشده بود (۱۳). گونه *Lysinibacter cavernae* در سال ۲۰۱۵ به عنوان گونه جدید از خانواده میکروباکتریاسه از یک غار در چین جدا شده است (۳۸). از این باکتری‌های توانمندی‌های بیوتکنولوژیک از جمله تولید آنتی‌بیوتیک گزارش نشده است. در ضمن جدایه *Lysinibacter sp.* UTMC 3606 به دست آمده در پژوهش کنونی نیز فاقد

1. Hamed J, Poorinmohammad N, Wink J. The role of actinobacteria in biotechnology. *Biology and biotechnology of actinobacteria*: Springer; 2017. p. 269-328.
2. Kurtböke D. Ecology and habitat distribution of actinobacteria. *Biology and biotechnology of Actinobacteria*: Springer; 2017. p. 123-49.
3. Thumar J, Singh SP. Antimicrobial Potential and Metabolite Profiling of Marine Actinobacteria. *Actinobacteria*: Springer; 2022. p. 241-64.
4. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*. 2012;7(4):e34953.
5. Hamed J, Mohammadipanah F, Klenk H-P, Pötter G, Schumann P, Spröer C, et al. *Streptomyces iranensis* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(7):1504-9.
6. Hamed J, Mohammadipanah F, Pötter G, Spröer C, Schumann P, Göker M, et al. *Nocardiopsis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011;61(5):1189-94.
7. Hamed J, Mohammadipanah F, von Jan M, Pötter G, Schumann P, Spröer C, et al. *Nocardiopsis sinuspersici* sp. nov., isolated from sandy rhizospheric soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(10):2346-52.
8. Mohammadipanah F, del Carmen Montero-Calasanz M, Schumann P, Spröer C, Rohde M, Klenk H-P. *Promicromonospora kermanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2017;67(2):262-7.
9. Mohammadipanah F, Hamed J, Spröer C, Rohde M, del Carmen Montero-Calasanz M, Klenk H-P. *Streptomyces zagrosensis* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014;64.40-3434:(10).
10. Mohammadipanah F, Hamed J, Spröer C, del Carmen Montero-Calasanz M, Schumann P, Klenk H-P. *Promicromonosporairanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from rhizospheric soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014;64(Pt\_9):3314-9.
11. Mohammadipanah F, Hamed J, Göker M, Fiebig A, Pukall R, Spröer C, et al. *Kribbellashirazensis* sp. nov., isolated from Iranian soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013;63(9):3369-74.
12. Mohammadipanah F, Hamed J, Schumann P, Spröer C, del Carmen Montero-Calasanz M, Klenk H-P. *Saccharothrix ecbatanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(Pt\_12):9-4544.
13. Hamed J, Kafshnouchi M, Ranjbaran M. A Study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. *Saudi journal of biological sciences*. 2019;26(7):1587-95.
14. Ortiz-Ortiz M. Kartchner caverns: habitat scale community diversity and function in a carbonate cave. 2012.
15. Gonzalez-Pimentel JL, Miller AZ, Jurado V, Laiz L, Pereira MF, Saiz-Jimenez C. Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
16. Asghar Moqadam, Asghar, Movid, Nadiri, Attaullah. Study of geomorphology, geology and genesis of Seholan Blue Cave, northwest of Iran. *Geography and planning*. 2006;22(12):59-91.

17. Mangamuri UK, Poda S, Naragani K, Muvva V. Influence of Cultural Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces cheonanensis* VUK-A Isolated from Coringa Mangrove Ecosystem. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*. 2012;6 (1).
18. Akhurst M. functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J Gen Microbiol*. (121):303.
19. Atlas RM. *Handbook of microbiological media*: CRC press; 2010.
20. Kumar V, Bisht GS, Institu S. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *Int J Eng Technol Manage Appl Sci*. 2010;2:2.
21. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2017;67(5):1613.
22. Hamed J, Imanparast S, Mohammadipanah F. Molecular, chemical and biological screening of soil actinomycete isolates in seeking bioactive peptide metabolites. *Iranian journal of microbiology*. 2015;7(1):23.
23. Buresova-Faitova A, Kopecky J, Sagova-Mareckova M, Alonso L, Vautrin F, Moëne-Loccoz Y, et al. Comparison of Actinobacteria communities from human-impacted and pristine karst caves. *MicrobiologyOpen*. 2022;11(2):e1276.
24. Coleine C, Delgado-Baquerizo M. Unearthing terrestrial extreme microbiomes for searching terrestrial-like life in the Solar System. *Trends in Microbiology*. 2022.
25. de Bruin S, Vasquez-Cardenas D, Sarbu S, Meysman F, Sousa D, van Loosdrecht M, et al. Sulfated glycosaminoglycan-like polymers are present in an acidophilic biofilm from a sulfidic cave. *Science of the Total Environment*. 2022;829:154472.
26. Farda B, Djebaili R, Vaccarelli I, Del Gallo M, Pellegrini M. Actinomycetes from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*. 2022;10(2):453.
27. Seo JP, Yun Y-W, Lee SD. *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007;57(12):2932-5.
28. Herzog Velikonja B, Tkavc R, Pašić L. Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology*. 2013;43(1):5.
29. Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS microbiology letters*. 2011,7(1) 211,02.
30. Groth I, Vettermann R, Schuetze B, Schumann P, Sáiz-Jiménez C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of microbiological methods*. 1999;36(1-2):115-22.
31. Groth PS, L. Laiz, S. Sanchez-Moral, JC Cañveras, C. Saiz-Jimenez, I. Geomicrobiological study of the grotta dei cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal*. 2001;18(3):241-58.
32. Tomczyk-Żak K, Zielenkiewicz U. Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*. 2016;33.38-20:(1).
33. Jurado V, Boiron P, Kroppenstedt RM, Laurent F, Couble A, Laiz L, et al. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2008;58(9):2210-4.

34. Shabarova T, Pernthaler J. Karst pools in subsurface environments: collectors of microbial diversity or temporary residence between habitat types. *Environmental microbiology*. 2010;12(4):1061-74.
35. Quintana ET, Badillo RF, Maldonado LA. Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013;104(1):63-70.
36. Almasi F, Kafshnouchi M, Mohammadipanah F, Hamed J. Fruit wrapping kraft coated paper promotes the isolation of actinobacteria using ex situ and in situ methods. *Folia Microbiologica*. 2021;66(6):1047-54.
37. Wood WW. Origin of caves and other solution openings in the unsaturated (vadose) zone of carbonate rocks: a model for CO<sub>2</sub> generation. *Geology*. 1985;13(11):822-4.
38. Tuo L, Guo L, Liu S-W, Liu J-M, Zhang Y-Q, Jiang Z-K, et al. *Lysinibacter cavernae* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Microbacteriaceae isolated from a karst cave. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2015;65(Pt\_10) 12-3305.
39. De Mandal S, Panda AK, Bisht SS, Kumar NS. First report of bacterial community from a bat guano using Illumina next-generation sequencing. *Genomics Data*. 2015;4:99-101.