NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/49 , 2023

Scan online to view this article

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

Maghsoud Kafshnouchi[1], Javad Hamedi[2,3*]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره۴۹ - زمستان ۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مطالعه تنوع اکتینوباکترهای قابل کشت در غار سهولان مهاباد و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها

مقصود کفشنوچی[1] و جواد حامدی*[2،3]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.
۲. بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. مرکز پژوهشی فناوری و فراورده 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 ضدمیکروبی 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 به‌منظور جداسازی اکتینوباکترها جمع آوری 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 ضدمیکروبی علیه ده باکتری و قارچ غربال شدند.

یافته‌ها: از ۱۳ نمونه به‌دست آمده از غار سهولان ۱۸ اکتینوباکتر شامل جنس‌های *Streptomyces*، *Micromonospora* 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 ضدمیکروبی بودند که از این میان ۳ جدایه متعلق‌به جنس *Streptomyces* و ۲ جدایه متعلق‌به جنس *Micromonospora* بوده است. ۳ جدایه علیه *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* فعالیت داشتند. یک جدایه علیه *Escherichia coli* TolC فعالیت داشت. فعالیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی را علیه *S. aureus*، *M. luteus* و *C. albicans* 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 ضدمیکروبی، 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، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران
پست الکترونیکی: jhamedi@ut.ac.ir.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

اعضای این گروه تولید شده است. کشف گونه‌های جدید از اکتینوباکترها، به‌ویژه اکتینوباکترهای نادر راه‌کار خوبی برای معرفی ترکیب‌های بیوشیمیایی ارزشمند مورد استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت است (۱). اکتینوباکترها باکتری‌های گرم مثبت با درصد GC بالا هستند که به‌صورت آزادزی، هم‌زیست با گیاهان و حیوانات و یا به‌صورت پاتوژن آن‌ها یافت می‌شوند (۲). ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که اکتینوباکتر منبع تولید یک سوم از محصول‌های بیوتکنولوژی میکروبی هستند (۳). این باکتری‌ها از محیط‌های مختلف خاکی و آبی از جمله غارها جدا شده اند. ویژگی اولیگوتروف بودن غارها می تواند منجر به هم‌زیستی طیف گسترده‌ای از گونه‌ها و هم-چنین تحریک روش‌های بی نظیر 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 اکتینوباکترها به‌دست آمده و تاکسون‌های جدید متعددی شامل گونه‌های *Streptomyces iranensis* (۵)، *Nocardiopsis arvandica* (۶)، *Nocardiopsis sinuspersici* (۷)، *Promicromonospora iranensis* (۸)، *Streptomyces zagrosensis* (۹)، *Promicromonospora kermanensis* (۱۰)، *Kribbella shiranzensis* (۱۱) و *Saccharothrix ecbatanensis* (۱۲) از کشور گزارش شده است. با این وجود اغلب فعالیت‌های فوق در مورد اکتینوباکترهای ایران بر روی نمونه‌های آبی و خاکی انجام شده است و تاکنون فقط یک گزارش در مورد اکتینوباکترهای 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 اکولوژیک مختلف در کنار سایر موجودات غارزی و فاکتورهای محیطی از جمله دی اکسید 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 گروه های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها را دارند. گروه‌های متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، آرکی‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها در غارها یافت می‌شوند. غارها می توانند هم چنین منابع میکروارگانیسم‌ها و مولکول‌های جدید مثل آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها باشند که ممکن است برای اهداف بیوتکنولوژیک مناسب باشند (۱۴).

میکرواگانیسم‌های غاری به لحاظ متابولیک متنوع هستند و می‌توانند انرژی را یا 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 آن هایی که ارزش علمی، هنری، توریستی دارند، مهم است (۱۵).

هدف پژوهش کنونی بررسی تنوع اکتینوباکترهای 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 پرمین 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 ۱۷۵۱متر 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 سیانوباکترها شده است که در شرایط طبیعی در غارها یافت نمی‌شوند. با این وجود گزارشی از وضعیت تنوع زیستی این غار منتشر نشده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

است.

با در نظر گرفتن تنوع فراوان اکتینوباکترهای نوین در ایران و ویژگی‌های ناشناخته غار سهولان به‌عنوان یک محیط الیگوتروف، در این پژوهش تنوع زیستی اکتینوباکترهای قابل کشت و فعالیت‌ها ضدمیکروبی این جدایه‌ها بررسی شده است.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری و آماده سازی نمونه‌ها

تعداد ۱۳ نمونه خاک، آب و حشرات زنده و مرده از قسمت‌های مختلف دیواره، سقف و کف غار سهولان جمع آوری شد (جدول۱).

جدول ۱. مشخصات محل نمونه‌برداری و ویژگی نمونه‌های 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/سیانوباکتر از حوضچه اصلی	طوسی گل‌بهی 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

نمونه‌ها در شرایط مناسب درون پلاستیک‌های زیپ‌دار و درون بطری‌های پلاستیکی در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل و تا زمان کشت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه‌های آب بدون هیچ پیش تیمار و تیماری مستقیم، در محیط‌های جداسازی کشت داده شدند. ولی نمونه‌های خاک و حشره به شرح زیر آماده سازی شدند.

برای آماده‌سازی نمونه‌های خاک، این نمونه‌ها در پلیت های شیشه‌ای استریل ریخته شده و به‌مدت یک روز در آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به‌منظور خشک شدن قرار گرفت (۱۷). هم‌چنین به‌منظور جهت آزاد شدن اسپورهای اکتینوباکترهای متصل‌به ذرات خاک، نمونه‌ها در هاون کوبیده شده و سپس از الک با قطر منفذ یک میلی‌متر عبور داده شد.

جهت کاهش رشد کپک‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های فراوان موجود در خاک، سه پیش تیمار خشک کردن، مایکروویو و سانتریفیوژ روی نمونه‌های خاک و یک تیمار افزودن آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت انجام گرفت (۶). به‌منظور خشک کردن نمونه‌های خاک، ۵ گرم از نمونه های خاک به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به‌منظور پیش تیمار مایکروویو، ۵ گرم از نمونه‌ها به‌مدت سه دقیقه در مایکروویو (شرکت سامسونگ، کره جنوبی) قرار گرفت. سپس ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به نمونه‌های خاک تیمار شده اضافه شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰rpm هم‌زده شد. به‌منظور پیش تیمار سانتریفیوژ، ۵ گرم از هر نمونه خاک به ۴۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل اضافه شده و به-مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰rpm هم‌زده شد. نمونه ها به تیوب فالکون ۵۰ استریل منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

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

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

محیط‌های کشت جهت جداسازی اولیه

به‌منظور جداسازی اولیه اکتینوباکترها، هشت نوع محیط کشت تهیه گردید. محیط‌ها شامل هیکی ترزنر آگار (Hickey Tresner agar)، عصاره خاک آگار (Soil extract agar)، کمپوست آگار (Compost agar)، سبوس برنج آگار (Rice bran agar)، اکتینومایست آگار (Actinomycete Agar)، نشاسته کازئین نیترات آگار (Starch casein nitrate agar)، محیط کشت ۲ پروژه بین المللی استرپتومایسس (International Project-ISP2) *Streptomyces* 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 اکتینومایست‌های بارز و HTA, CA, RBA و AA برای جداسازی اکتینومایست‌های نادر مناسب‌تر هستند. این محیط‌های کشت به دو صورت بدون آنتی‌بیوتیک و نیز دارای آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (جابر ابن حیان، تهران، ایران) به‌مقدار µg/ml ۵۰ استفاده شد (۱۹).

نمونه‌های آب، خاک و حشرات بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت فوق تلقیح و به‌مدت ۱۰-۱۴ روز در دمای ^{o}C ۲۸ گرماگذاری شد.

بررسی رشد و مورفولوژی

میزان رشد سویه‌ها، رنگ میسلیوم زمینی، رنگ میسلیوم 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).

نگهداری جدایه‌ها

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

شناسایی مولکولی سویه‌ها

برای شناسایی مولکولی، ابتدا بیوماس باکتری‌ها با کشت در ۲۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث در فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری، گرماگذاری به مدت ۴-۵ روز در شیکر انکوباتور (شرکت ویژن ساینتیفیک، کره جنوبی) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سانتریفوژ در rpm ۴۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌دست آمد. با محلول نرمال سالین شسته و دوباره سانتریفیوژ شد. به‌منظور استخراج DNA، رسوب بیوماس به‌دست آمده به کمک نیتروژن مایع و هاون چینی کوبیده، در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون و به‌مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برای استخراج DNA به کمک کیت استخراج DNA شرکت پویا ژن آزما به‌کار 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 CAG -3’ (Tm: ۵۶)

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

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). دناتوره شدن اولیه در دمای ^{o}C ۹۶ و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. ۳۰ چرخه تکثیر شامل ۴۵ ثانیه در دمای ^{o}C ۹۴، 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 به‌منظور 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 EzBioclaud انجام شد (۲۱).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

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_2HPO_4 (Merck, Germany)	۰/۵
Calcium chloride (Merck, Germany)	۰/۰۲	KCl (Merck, Germany)	۱/۷
N-Z-Amine (Difco, USA)	۲	$MgSO_4$ (Merck, Germany)	۰/۵
Agar (Ibresco)	۱۵	$CaCO_3$ (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 extrac (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_2HPO_4 (Merck, Germany)	۰/۵	Sodium chloride (Ibresco)	۲
$MgSO_4$ (Merck, Germany)	۰/۱	K_2HPO_4 (Merck, Germany)	۲
$FeSO_4$ (Merck, Germany)	۰/۰۰۱	$MgSO_4$ (Merck, Germany)	۰/۰۵
Glycerol (Merck, Germany)	۵	$CaCO_3$ (Merck, Germany)	۰/۰۲
Agar (Ibresco, Iran)	۱۵	$FeSO_4$ (Merck, Germany)	۰/۰۱
pH 8		Agar (Ibresco, Iran)	۱۵
		pH 8	
International *Streptomyces* 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	

بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها

ابتدا پیش کشت از هر سویه با تلقیح در محیط کشت ISP2 براث، گرماگذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور (ویژن ساینتیفیک، کره جنوبی) با دور ۲۲۰ rpm گرماگذاری تهیه شد. از پیش کشت تهیه شده در محیط ISP2 براث با حجم بیش‌تر تلقیح و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۲۰۰rpm به‌مدت ۷ روز گرماگذاری شد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

(۲۲). مـایع تخمیـر بـه‌مـدت ۱۰ دقیقـه و ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی بـرای سـنجش میـزان تولیـد ماده ضدمیکربی مورد استفاده قرار گرفت.

سـویه‌هـای مـورد سـنجش (جـدول ۳) بـر روی محـیط مولرهینتون آگار کشت داده شد و به‌مـدت ۲۴ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. تعداد بـاکتری در سوسپانسیون تلقیحی بـه محـیط کشـت مولرهینتـون آگار در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ با استفاده از استاندارد ۰/۵ مـک فارلند تنظیم شد.

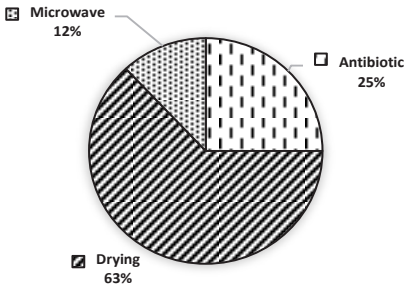
جدول ۳. سویه‌های حساس مورد استفاده برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های اکتینوباکتر

نام سویه	کدUTMC
Micrococcus luteus	1461
Escherichia coli TolC	1462
Pseudomonas aeruginosa	1463
Bacillus subtilis	1464
Escherichia coli	1465
Chromobacterium violaceum	1466
Staphylococcus aureus	1467
Candida albicans	5055
Pichia anomala	5056
Mucor hiemalis	5057

مقدار ۱۰۰µl از سویه‌های حساس بـا غلظـت نـیم مـک-فارلند روی محیط پلیت مولرهینتون آگار قرار داده شـد و با سوآب استریل به‌صورت یکنواخت در سرتاسر گسترانیده شـد. از مـایع رویـی کشـت سـویه مـورد نظـر ۱۰۰µl در چاهک‌های به قطر ۱۰ mm ایجاد شـده در پلیـت تلقـیح شد. پلیت‌ها به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس و سپس در دمـای ۳۷°C انکوباسـیون شـدند. پـس از ۲۴ ساعت میـزان هالـه عـدم رشـد توسـط کـولیس بـا دقـت ±۰/۱mm اندازه‌گیری شد.

نتایج

این پژوهش با هدف بررسی فراوانی اکتینوباکترهای غار سهولان انجام شده است. مشخصات محل‌های نمونه-برداری، ویژگی‌های نمونه‌ها در جدول (۱) آورده شده است. از ۱۳ نمونه جمع‌آوری شده از غار سهولان، پس از حذف نمونه‌های تکراری و نمونه‌های غیر از اکتینوباکتر، به‌طور جمع ۸ جدایه اکتینوباکتر به‌دست آمده است. فراوانی این جدایه‌ها در شرایط مختلف در شکل (۱) نشان داده شده است.



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

تعداد سویه‌های 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-های دیگر شامل محیط‌های SCA، AA، HT، NA و SEA محیط مناسبی در مقایسه با سایر محیط‌ها نبوده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های اکتینوباکتر

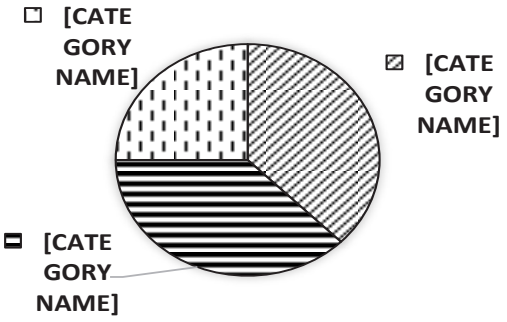
تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی اکتینوباکترهای جدا شده از غار سهولان در شکل (۳) آورده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

نتیجه تکثیر محصول PCR ژن16S 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 و *Lysinibacter* تعلق داشتند (جدول۴). 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 ضدمیکروبی جدایه‌ها

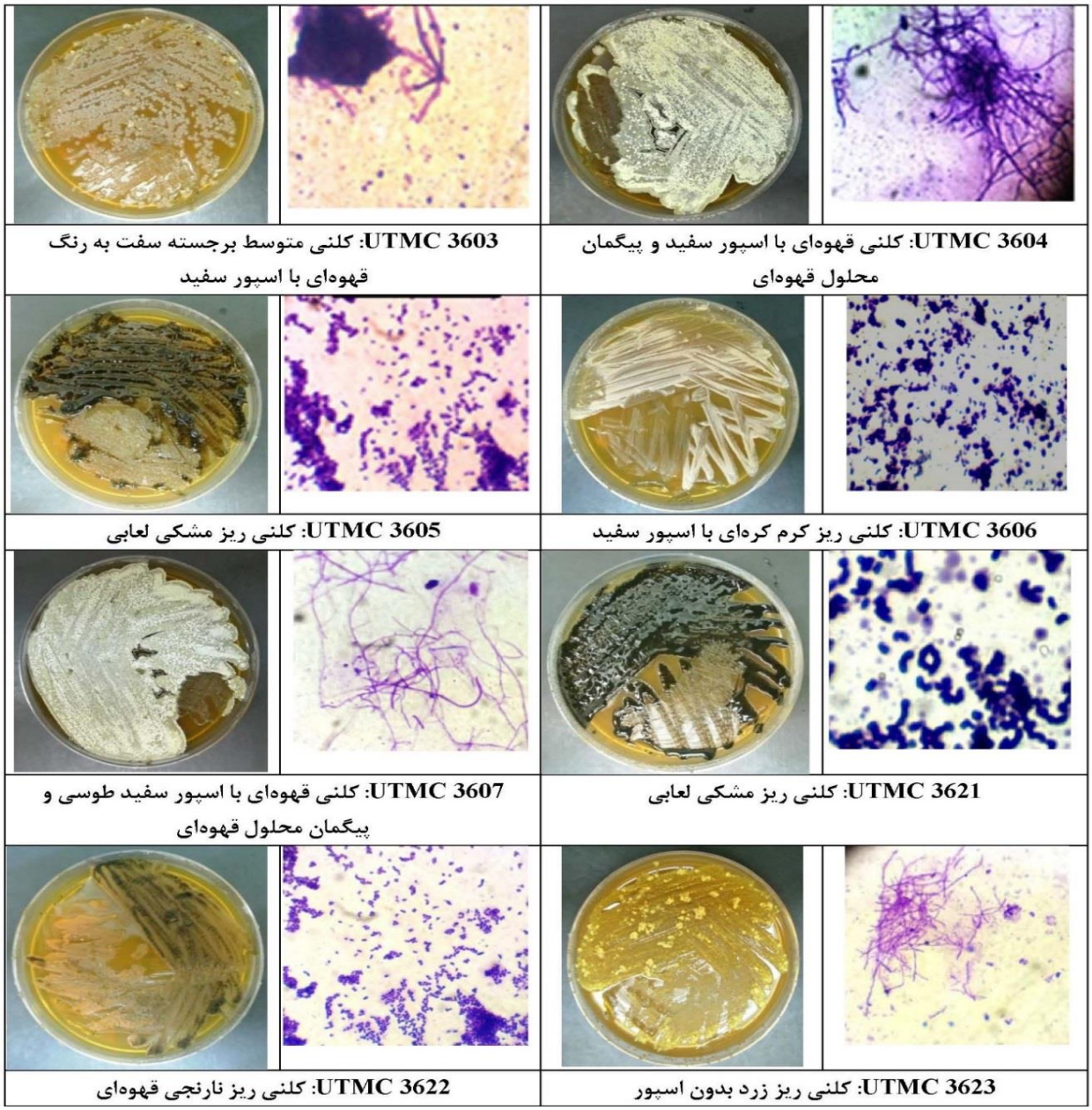
از ۸ جدایه اکتینوباکتریایی حاصل از غار سهولان هامپوئیل ۵ جدایه دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند. ۳ جدایه علیه *Staphylococcus aureus* UTMC1467 و *Micrococcus luteus* UTMC1461 فعالیت داشتند. یک جدایه علیه *Escherichia coli* TolC UTMC1462 فعالیت داشت. فعالیت ضدمیکروبی علیه سویه *Bacillus subtilis* UTMC1464 در ۱ سویه دیده شد. ۳ جدایه نیز فعالیت علیه *Candida albicans* UTMC5055 نشان دادند. جدایه *Micromonospora* sp. UTMC3322 بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی علیه سه سویه را نشان داد. هیچ‌یک از سویه‌ها فعالیتی علیه *Pseudomonas aeruginosa* UTMC1463, *Escherichia coli* UTMC1465، *Chromobacterium violaceum* UTMC1466, *Pichia anomala* UTMC5055 و *Mucor hiemalis* UTMC5057 دیده نشد.



شکل ۲. درصد اکتینوباکترهای جدا شده بر روی محیط‌های جداسازی مورد استفاده(HT[2], AA[1]، ISP_2 ، CA، RA، NA[3]، SCA و SEA[4]) از غار سهولان.

[1] Actinomycete Agar
[2] Hickey Tresner agar
[3] Nutrient Agar
[4] Soil extract agar

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]



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

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

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

بحث

در سال‌های اخیر به محیط‌های کم‌تر شناخته شده و دارای شرایط زیستی سخت[1] مانند دریاها و بیابان‌ها به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 وابسته‌به 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 jejuensis*، *Nocardia speluncae* در مطالعه‌های اخیر از غارهای طبیعی کره جنوبی جداشده است. به‌طور تقریبی ۳۵۰ اکتینوباکتر با روش‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و کموتاکسونومیکی در غارها شناسایی شده است (۲۷). اکتینوباکترها فراوان‌ترین جدایه‌ها از جمعیت باکتریایی غارهای پاسارجویا جاما[2] (۲۸)، آلتامیرا[3] (۲۹) و تیتوبوستیلو[4] (۳۰) بوده‌اند. نیمی از اکتینوباکترهای غار کارلزباد کاورن را جنس *Pseudonocardia* تشکیل می‌دهد. از سنگ‌های غار گروتادل‌فیوم[5] 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*، *Propionibacterium*، *Corynebacterium*، *Gordonia* و *Frankia* بوده است (۳۲). یک اکتینوباکتر جدید از غار آلتامیرا جداسازی شده و *Nocardia altamirensis* نام‌گذاری شده است (۳۳). بیوفیلم اکتینوباکترهای غار بتز[6] شامل جنس‌های *Arthrobacter*، *Curtobacterium*، *Promicromonospora*، *Rhodococcus*، *Nocardia*، *Micrococcus*، *Blastococcus*، *Blastococcus*، *Streptomyces* و *Kribbella* بوده است (۳۴). گونه‌های قابل کشت اکتینوباکترها از کریستال‌ها و دیواره کریستالی غار چیهواهوا[7] واقع در مکزیک با دمای ثابت ۵۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰۰٪ جدا شده‌اند. همه جدایه‌ها به طور نزدیکی مرتبط با جنس *Prauserella* متعلق‌به 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 غنی‌سازی 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 *Streptomyces*، *Micromonospora*، *Micrococcus*، *Kocuria* و *Corynebacterium* 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 جدایه‌های 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 متعلق‌به 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

با مقایسه نتایج پـژوهش کنـونی بـا پـژوهش Hamedi و همکاران (۱۳) که روش پژوهش یکسانی را به‌کار برده‌انـد، می‌توان گفت علت تفـاوت نتـایج مشـاهده شـده بـین دو پژوهش می‌تواند ناشی از ساختار دو غار باشد. غار سهولان از جمله غارهای کربناتی (۱۶) است، که از جمله فـراوان-ترین انواع غارها است. این غارها از انحلال سنگ‌هایی مثل سنگ آهک و دولومیت در طول میلیون‌ها سال ایجاد شده اند (۳۷). غار سـهولان سـاختار خاصـی دارد کـه شـرایط مطالعه آن را به‌طور کلی با غـار هامپوئیـل متفـاوت کـرده است. در مورد غار هامپوئیل وجود یک پرتگـاه حـدود ۲۰ متری در ورودی بخش تاریک و نیز تاریکی حاکم بـر ایـن بخش سبب شده تا انسان‌های محدودی در این بخـش‌هـا آمد و شد داشته باشند. ولی در مورد غار سهولان وضعیت به‌طور کامل متفاوتی دیده می‌شـود. ورودی غـار سـهولان هم‌سطح زمین قرار داشته و در آن دو مسیر خشکی و آبی ساخته شده است. در مسیر خشکی پلـه‌هـای بتـونی و در مسیر آبی قایق‌های کرایـه‌ای، سـبب تسـهیل آمـد و شـد بازدیدکنندگان غار می‌شوند. در ضمن این دو مسیر آبی و خاکی در وسط غار به‌هم می‌رسند. وجـود گـردش‌گـران و آلودگی‌های ناشـی از حضـور آن‌هـا، سـبب شـده تـا غـار سهولان برای مطالعه تنوع زیستی چندان مناسب نباشـد، زیرا وجود نور مصنوعی سبب شده تـا بـر خـلاف غارهـای تاریک که شیمیولیتوتروف ها و هتروتروف‌هـا بخـش‌هـای اصـلی زنجیـره غـذایی را تشـکیل مـی‌دهنـد، موجـودات فتوتروف شامل سیانوباکترها و جلبک‌ها پوشش سبز رنـگ و ضخیمی را در بخش‌های مختلف غـار سـهولان تشـکیل دهند و این کار سبب شده تا توالی اکولوژیک طبیعی غـار بـر هـم خـورده و تنـوع زیسـتی متفـاوتی بـه‌نسـبت غـار هامپوئیل دیده شود. تنـوع زیسـتی غـار هامپوئیـل بسـیار بیش‌تر از غار سهولان بوده و در بین جدایه‌های حاصـل از غار هامپوئیـل عـلاوه‌بـر اعضـای جـنس *Streptomyces*، *Micromonospora* و *Kocuria* که در هر دو غار یافـت شده، سویه‌های متعلـق‌بـه جـنس‌هـای *Micrococcus* و *Corynebacterium* نیز گزارش شده است (۱۳). اگر چه در بین جدایه‌های غار سهولان سویه *Lysinibacter* sp. UTMC 3606 بـا ۹۹/۳٪ شـباهت‌بـه *Lysinibacter cavernae* ، یافت شده که در قبل از غار هامپوئیـل جـدا نشده بود (۱۳). گونه *Lysinibacter cavernae* در سال ۲۰۱۵ به‌عنوان گونه جدید از خـانواده میکروباکتریاسـه از یک غار در چین جدا شده است (۳۸). از این باکتری‌هـای توانمندی‌های بیوتکنولوژیک از جمله تولید آنتـی‌بیوتیـک گزارش نشده است. در ضمن جدایـه *Lysinibacter* sp. UTMC 3606 به‌دست آمده در پژوهش کنونی نیز فاقـد فعالیت ضدمیکروبی بوده است.

اگرچه تعداد نمونه‌های جداشده از غار سهولان بـه‌نسـبت نمونه‌های غار هامپوئیل بسیار کم بوده، ولی در هر دو غـار تعداد اکتینوباکترها در نمونه‌های غنی از مواد غذایی بیش از نمونه‌های غیرغنی شده الیگوتروف بـوده اسـت. نتیجـه مشابهی در مطالعه‌های پیشین نیز دیده شده اسـت (۳۹). در هر صورت همـان‌گونـه کـه گفـت روش غنـی‌سـازی و جداسازی به‌کار رفته در هر پژوهش می‌تواند تأثیر زیـادی در سویه‌های به‌دست آمده داشته باشد.

فعالیت ضـدمیکروبی در حـدود ٪۶۲ از جدایـه‌هـای غـار سهولان دیده شده، ولـی حـدود ٪۲۵ از جدایـه‌هـای غـار هامپوئیل فعالیت ضدمیکروبی داشته‌انـد. اگـر چـه تعـداد نمونه‌های غار سهولان کم بوده و به‌سختی می‌توان از نظـر آماری به آن تکیه کرد، در ضمن با توجـه‌بـه رفـت و آمـد فراوان گردشگران در این غار، امکان آلـوده شـدن محـیط غار به سویه‌های میکروبی خارج از غار وجود دارد.

نتیجه‌گیری

براسـاس نتـایج بـه‌دسـت آمـده از ایـن پـژوهش و دیگـر مطالعه‌های انجام شده در غارهای ایران می‌توان گفت ایـن غارها محـیط‌هـای ارزشـمندی بـرای مطالعـه‌هـای تنـوع زیستی و جداسازی اکتینوباکترهـا هسـتند. ولـی غارهـای دست نخورده و بکر بیش‌تر ترجیح داده می‌شود. در ضمن غارهای توریستی می‌توانند موضوع مناسبی بـرای بررسـی تأثیر انسان و توریسم بر تنوع زیستی غارها باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

منابع

1. Hamedi 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. Hamedi 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. Hamedi 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. Hamedi 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, Hamedi 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, Hamedi 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, Hamedi 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, Hamedi 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. Hamedi 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

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. Hamedi 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, Moënne-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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]

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, Hamedi 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 CO2 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.13.49.11.5]