



Scan online to view this article

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

Maghsoud Kafshnouchi¹, Javad Hamed^{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. Sahoulán 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 Sahoulán 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 Sahoulán 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 Sahoulán cave was less than Hampoíl cave, but the biological activity of the isolates was higher. Study of tourist caves such as the Sahoulán Cave can be a good subject to study the impact of humans and tourism on the biodiversity of caves.

Keywords: Actinobacteria, Biodiversity, Sahoulán 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: jhamed@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 جدایه ها مقصود کفشنوجی^۱ و جواد حامدی^{۲*}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.
۲. بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشکده گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. مرکز پژوهشی فناوری و فراورده های میکروبی دانشگاه تهران.

چکیده

سابقه و هدف: غارها محیط های الیگوتروف و تاریکی هستند که کم تر مطالعه شده و می توانند محیط های مناسبی از نظر منبع سویه های امیدوارکننده در زیست فناوری 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 آن ها بوده است.

مواد و روش ها: در این پروژه، نمونه های مختلف از خاک، آب، کف، دیوار و سقف غار و هم چنین بی مهرگان غار سهولان به منظور جداسازی اکتینوباکترها جمع آوری شد. برای تسهیل جداسازی، نمونه های جمع آوری شده تحت سه پیش تیمار (سانتریفیوژ کردن، خشک کردن و گذاشتن در مایکروویو) و یک تیمار آنتی بیوتیکی قرار گرفت و نمونه ها در ده محیط جداسازی متفاوت کشت شد. هم چنین جدایه ها از نظر تولید مواد ضد میکروبی علیه ده باکتری و قارچ غربال شدند.

یافته ها: از ۱۳ نمونه به دست آمده از غار سهولان ۱۸ اکتینوباکتر شامل جنس های *Micromonospora*، *Streptomyces* و *Lysinibacter* جدا شدند. سویه ویژه *Lysinibacter* sp. UTMC 3606، ۹۹/۳٪ شباهت به *Lysinibacter cavernae* داشته است که در سال ۲۰۱۵ به عنوان گونه جدید از یک غار در چین جدا شده است. از ۸ جدایه به دست 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 بیش ترین فعالیت ضد میکروبی را علیه *S. aureus*، *M. luteus* و *C. albicans* فعالیت نشان داد.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه های دیگر انجام شده در مورد غارهای ایران نشان می دهد که غارها محیط های ارزشمندی برای مطالعه های تنوع زیستی و جداسازی اکتینوباکترها هستند، ولی غارهای بکر بیش تر ترجیح داده می شود. تنوع اکتینوباکتریایی در غار سهولان نسبت غار هامپوئیل کم تر بوده، ولی فعالیت زیستی جدایه ها بیش تر بوده است. مطالعه بر غارهای توریستی مانند غار سهولان می تواند 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 ترکیب های زیستی ارزشمند هستند و بسیاری از داروهای تجاری توسط

نویسنده مسئول:

بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، دانشکده گان علوم، دانشگاه تهران
پست الکترونیکی: jhamedi@ut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

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

میکروارگانیسم‌های غاری به لحاظ متابولیک متنوع هستند و می‌توانند انرژی را یا به‌طور مستقل از طریق فعالیت‌های نوری-شیمیایی اتوتروفي یا از طریق فعالیت‌های هتروتروفي 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). اکتینوباکتری‌ها باکتری‌های 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 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 اکتینوباکتری‌ها 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 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 می‌تواند 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 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 اسپور های 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 ساینترفیک، کره جنوبی) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سانتریفوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه به دست آمد. با محلول نرمال سالین شسته و دوباره سانتریفوژ 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 ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ 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: ۵۶°C-3')

1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC
(Tm: ۵۶°C-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). دناتوره 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. خالص سازی 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 ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ 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)، کمپوست آگار (Compost agar)، سیوس برنج آگار (Rice bran agar)، اکتینوماست آگار (Actinomycete Agar)، نشاسته کازئین نیترات آگار (Starch casein nitrate agar)، محیط کشت ۲ پروژه بین المللی استرپتومایسس (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 و AA برای جداسازی 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.

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 ₂ HPO 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 ₂ HPO ₄ (Merck, Germany)	۰/۵	Sodium chloride (Ibresco)	۲
MgSO ₄ (Merck, Germany)	۰/۱	K ₂ HPO 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 <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 ساینترفیک،

(۲۲). مایع تخمیر به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای سنجش میزان تولید ماده ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

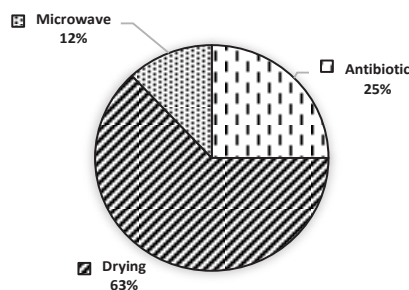
سویه های مورد سنجش (جدول ۳) بر روی محیط

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

نام سویه	کد UTM
<i>Micrococcus luteus</i>	1461
<i>Escherichia coli</i> TolC	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.



شکل ۱. تأثیر تیمار آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و پیش تیمارهای خشک کردن و میکروویو 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.

مقدار ۱۰۰ μl 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 ۱۰۰ μl در چاهک های به قطر ۱۰ mm ایجاد شده در پلیت تلقیح شد. پلیت ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس و سپس در دمای ۳۷°C انکوباسیون شدند. پس از ۲۴ ساعت میزان هاله عدم رشد توسط کولیس با دقت ±۰/۱ mm اندازه گیری شد.

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

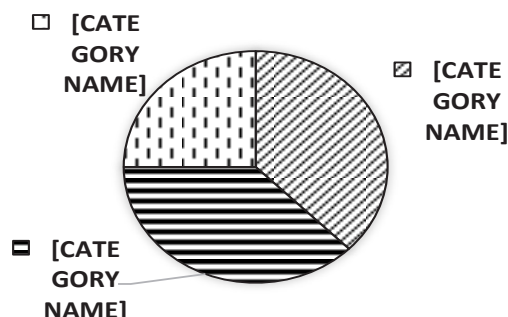
تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی اکتینوباکترهای جدا شده از غار سهولان در شکل (۳) آورده شده است.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

نتیجه تکثیر محصول PCR ژن 16S rRNA و آنالیز نتایج حاصل و مقایسه تعیین توالی آنها با سویه‌های 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



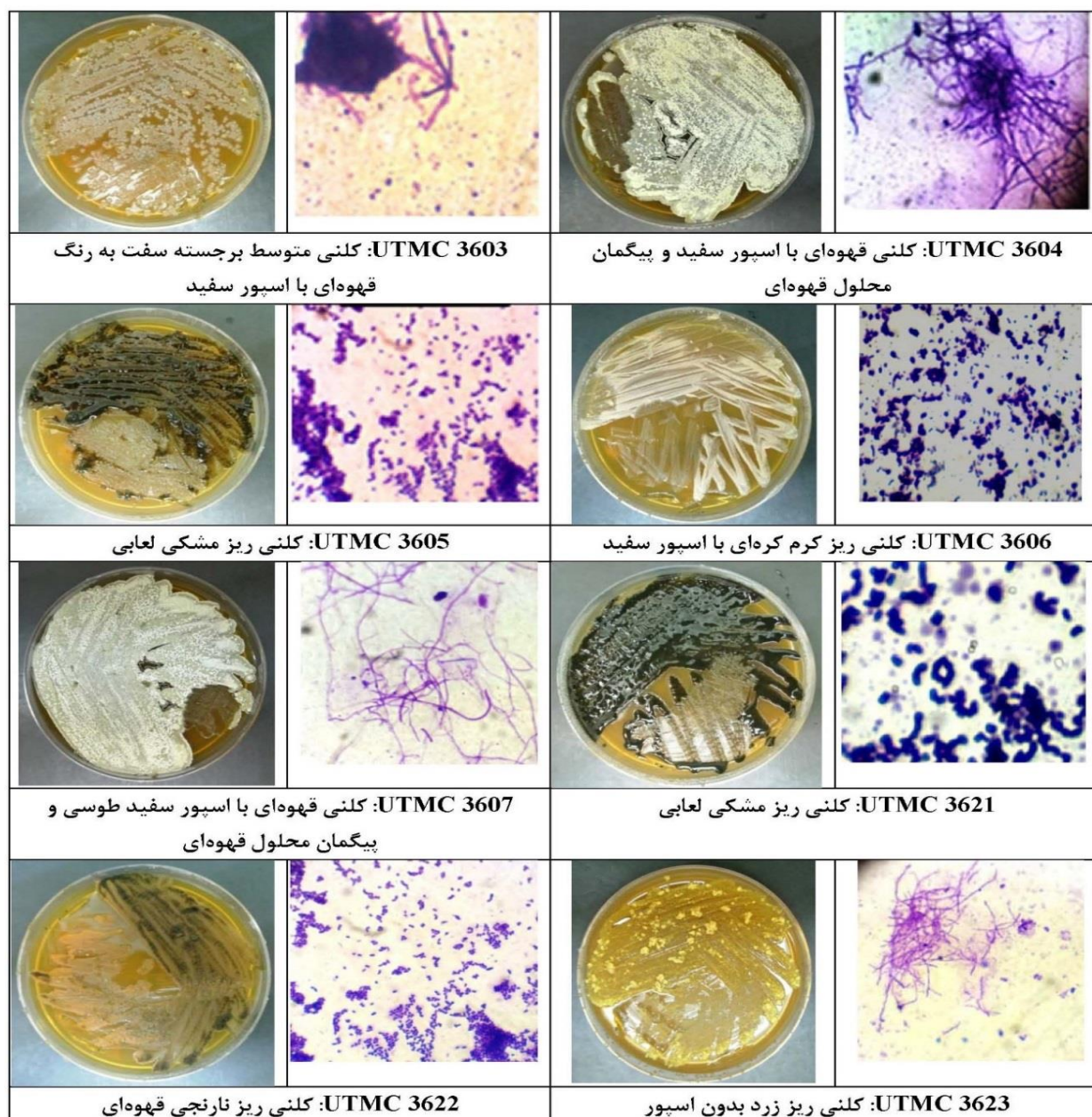
شکل ۲. درصد اکتینوباکترهای جدا شده بر روی محیط‌های جداسازی مورد استفاده (SEA^۴ و SCA, NA^۳, RA, CA, ISP₂, AA^۱, HT^۲) از غار سهولان.

^۱ Actinomycete Agar

^۲ Hickey Tresner agar

^۳ Nutrient Agar

^۴ 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 سال های اخیر به محیط های کم تر شناخته شده و دارای شرایط زیستی سخت^۱ مانند دریاها و بیابان ها به عنوان منابع جدید ذخایر ژنتیکی توجه شده است (۲۳). غارها با مقادیر محدود مواد غذایی، دمای ثابت و پایین، رطوبت بالا و غلظت های بالای مواد معدنی می توانند به عنوان محیط های سخت برای حیات در نظر گرفته شوند و زیستگاه های اکولوژیکی خاصی را برای میکروارگانیسم های به شدت 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 محیط ها اشکال محدودی از زندگی وابسته به منابع حداقل انرژی (توسط باد یا آب های چکنده از سقف و دیوارهای غار) یا فعالیت های شیمیواتولیتوتروفی (اکسیداسیون گوگرد یا آمونیوم) وجود دارد (۲۵). آب ورودی، بازدیدکننده ها و حیوانات می توانند ورود مواد آلی را به درون غار فراهم کنند و حیات را برای میکروارگانیسم های هتروتروف در برخی غارها تسهیل کنند.

بررسی تنوع زیستی باکتری ها در غارهای طبیعی حضور بارز اکتینوباکترها را نشان داده است (۲۶). دو جنس *Nocardia speluncae*، *Nocardia jejuensis* مطالعه های اخیر از غارهای طبیعی کره جنوبی جدا شده است. به طور تقریبی ۳۵۰ اکتینوباکتر با روش های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و کموتاکسونومیکی در غارها شناسایی شده است (۲۷). اکتینوباکترها فراوان ترین جدایه ها از جمعیت باکتریایی غارهای پاسارجویا جاما^۲ (۲۸)، آلتامیرا^۳ (۲۹) و تیتوبوستیلو^۴ (۳۰) بوده اند. نیمی از اکتینوباکترهای غار کارلزباد کاورن را جنس *Pseudonocardia* تشکیل می دهد. از سنگ های غار گروتادل فیوم^۵ اکتینوباکترهای جنس *Acidimicrobium* جدا شده است. این باکتری ها، هتروتروف های اکسید کننده سولفور هستند که به طور غالب با شرایط محیطی به شدت اسیدی سازگار هستند (۳۱). در تجمع های سفید رنگ غار آلتامیرا، اکتینوباکترها یکی از بزرگترین گروه های باکتریایی شامل جنس های *Pseudonocardia*، *Corynebacterium*، *Propionibacterium*

Frankia و *Gordonia* بوده است (۳۲). یک اکتینوباکتر جدید از غار آلتامیرا جداسازی شده و *Nocardia altamirensis* نام گذاری شده است (۳۳). بیوفیلیم اکتینوباکترهای غار بتز^۶ شامل جنس های *Arthrobacter*، *Curtobacterium*، *Nocardia*، *Rhodococcus*، *Promicromonospora*، *Blastococcus*، *Micrococcus*، *Streptomyces* و *Kribbella* بوده است (۳۴). گونه های قابل کشت اکتینوباکترها از کریستال ها و دیواره کریستالی غار چیپوهاوا^۷ واقع در مکزیک با دمای ثابت ۵۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰۰٪ جدا شده اند. همه جدایه ها 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 می توان 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 جمع آوری شده از غار هامپوئیل ۷۶ اکتینوباکتر شامل جنس های *Micrococcus*، *Micromonospora*، *Streptomyces*، *Kocuria* و *Corynebacterium* جدا شده است (۱۳). ولی در پژوهش انجام شده در سال ۲۰۲۱ توسط Almasi و همکاران (۳۶) بر این غار محیط های کشت در خاک غار و به کمک ابزار خاصی مدفون (*in situ* cultivation) شده است. نمونه ها پس از ۳ ماه از خاک خارج شده و سویه های رشد کرده بر سطح محیط کشت جداسازی، خالص سازی و شناسایی شده است. این جدایه ها با جدایه ها پیشین به دست آمده از غار هامپوئیل (۱۳) متفاوت بوده است، در پژوهش Almasi و همکاران (۳۶) به روش *in situ* cultivation، ۱۵ جدایه اکتینوباکتریایی به دست آمده که متعلق به جنس های *Streptomyces*، *Kribbella*، *Micromonospora* و *Oerskovia* بوده است. تفاوت این نتایج می تواند به دلیل تفاوت محیط های کشت به کار رفته و نیز نوع روش جداسازی *in situ* و *ex situ* باشد.

⁶ - Bats

⁷ - Chihuahua

¹ - Extreme

² - Pajsarjeva jama

³ - Altamira

⁴ - Tito Bustillo

⁵ - Grotta del Fium

فعالیت ضد میکروبی بوده است.

اگرچه تعداد نمونه های جدا شده از غار سهولان به نسبت نمونه های غار هامپوئیل بسیار کم بوده، ولی در هر دو غار تعداد اکتینوباکترها در نمونه های غنی از مواد غذایی بیش از نمونه های غیر غنی شده الیگوتروف بوده است. نتیجه مشابهی در مطالعه های پیشین نیز دیده شده است (۳۹). در هر صورت همان گونه که گفت روش غنی سازی و جداسازی به کار رفته در هر پژوهش می تواند تأثیر زیادی در سویه های به دست آمده داشته باشد.

فعالیت ضد میکروبی در حدود ۶۲٪ از جدایه های غار سهولان دیده شده، ولی حدود ۲۵٪ از جدایه های غار هامپوئیل فعالیت ضد میکروبی داشته اند. اگر چه تعداد نمونه های غار سهولان کم بوده و به سختی می توان 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 سویه های میکروبی خارج از غار وجود دارد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش و دیگر مطالعه های انجام شده در غارهای ایران می توان گفت این غارها محیط های ارزشمندی برای مطالعه های تنوع زیستی و جداسازی اکتینوباکترها هستند. ولی غارهای دست نخورده و بکر بیش تر ترجیح داده می شود. در ضمن غارهای توریستی می توانند 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 برده اند، می توان گفت علت تفاوت نتایج مشاهده شده بین دو پژوهش می تواند ناشی از ساختار دو غار باشد. غار سهولان از جمله غارهای کربناتی (۱۶) است، که از جمله فراوان ترین انواع غارها است. این غارها از انحلال سنگ هایی مثل سنگ آهک و دولومیت در طول میلیون ها سال ایجاد شده اند (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 انسان های محدودی در این بخش ها آمد و شد داشته باشند. ولی در مورد غار سهولان وضعیت به طور کامل متفاوتی دیده می شود. ورودی غار سهولان هم سطح زمین قرار داشته و در آن دو مسیر خشکی و آبی ساخته شده است. در مسیر خشکی پله های بتونی و در مسیر آبی قایق های کرایه ای، سبب تسهیل آمد و شد بازدیدکنندگان غار می شوند. در ضمن این دو مسیر آبی و خاکی در وسط غار به هم می رسند. وجود گردشگران و آلودگی های ناشی از حضور آن ها، سبب شده تا غار سهولان برای مطالعه تنوع زیستی چندان مناسب نباشد، زیرا وجود نور مصنوعی سبب شده تا بر خلاف غارهای تاریک که شیمیولیتوتروف ها و هتروتروف ها بخش های اصلی زنجیره غذایی را تشکیل می دهند، موجودات فتوتروف شامل سیانوباکترها و جلبک ها پوشش سبز رنگ و ضخیمی را در بخش های 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 بیش تر از غار سهولان بوده و در بین جدایه های حاصل از غار هامپوئیل علاوه بر اعضای جنس *Streptomyces*، *Micromonospora* و *Kocuria* که در هر دو غار یافت شده، سویه های متعلق به جنس های *Micrococcus* و *Corynebacterium* نیز گزارش شده است (۱۳). اگر چه در بین جدایه های 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 باکتری های توانمندی های بیوتکنولوژیک از جمله تولید آنتی بیوتیک 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, Moënné-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 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.