جداسازی استرپتومیست های بازدارنده ی رشد انتروکوک مقاوم به ونکومایسین از خاک های زراعی شهر قم

فاطمه الزاملی, *احمد علی پوربابایی , سید سهیل آقایی

دانشجوی کارشناسی ارشد , دانشگاه آزاد اسلامی, واحد قم , ایران

*گروه میکروبیولوژی , دانشگاه آزاد اسلامی , واحد قم , ایران ahmadalipb@gmail.com

گروه میکروبیولوژی , دانشگاه آزاد اسلامی , واحد قم , ایران

چکیده

عفونت های ناشی از انتروکوکسی های مقاوم به ونکومایسین (VRE) در تمامی دنیا در حال افزایش است.مقاومت این باکتری ها به آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی در ارتباط با ژن های van A,B,C,D,E است که باعث کاهش تاثیر این آنتی بیوتیک ها در دیواره ی این باکتری ها می شود. اکثر نمونه های VRE متعلق به انتروکوکوس فیشیوم هستند که به طور ذاتی به توبرامایسین مقاوم اند بنابرین از جنتامایسین بعنوان آمینوگلیکوزید انتخابی برای درمان ترکیبی با عوامل باکتریسیدال استفاده می شود .اخیرا گزارش شده که بسیاری از VRE ها مقاومت بسیار بالایی به همه ی آمینوگلیکوزید ها وحتی جنتامایسین نشان میدهد. با توجه به گسترش سویه های مقاوم انتروکوکی ، لذا این تحقیق برای یافتن مواد ضد میکروبی جدید برای مقابله با انتروکوک مقاوم به ونکومایسین انجام شده است.

بعد از نمونه برداری از خاک های زراعی قم و روستاهای اطراف , جداسازی و شناسایی سویه های استرپتومایسس بر روی محیط ISP4 انجام شد .پس از جداسازی و خالص سازی، جدایه ها را بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در محیط کشت MHA,BHI,Hicky trenser medium اثر داده شد.در مجموع از ۱۲۵ جدایه ۵ جدایه توانایی بازدارندگی رشد بر علیه VRE را نشان دادند. سویه ای که بیش ترین هاله ی عدم رشد بر علیه انتروکوکی نشان داد از لحاظ صفات بیوشیمیایی و مرفولوژی و براساس توالی 16s rRNA مورد شناسایی قرار گرفت .نتایج شناسایی نشان داد که جدایه برتر به میزان ۱۰۰ درصد مشابه *Streptomyses tendae ATTC* 19812 می باشد.آنالیز GC-Mass پس از استخراج ماده موثره بوسیله حلال اتیل استات از محیط کشت نشان داد که ماده موثر احتمالا" یک ترکیب کویینولینی باشد.

واژگان کلیدی: جداسازی استرپتومیست , انتروکوک مقاوم به ونکومایسین

مقدمه

یکی از مشکلات اصلی در ارتباط با انتروکوک‌ها این است که آن‌ها می‌توانند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها خیلی مقاوم باشند. یکی از علل اصلی مقاومت سریع نسبت به عوامل ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها، ناشی از کار بردن نابجای این ترکیبات ضد میکروبی است که منجر به افزایش میزان عفونت‌ها و حتی مرگ و میر در بیماران میزبان می‌شود (Yehude *et al*,2002).

افزایش تعداد پاتوژن‌های مقاوم به دارو و همچنین کاهش موفقیت‌ها در به کارگیری ترکیبات مؤثر در درمان‌های شیمیایی باعث شده است تا محققان در پی یافتن راهکارهای جدیدی برای درمان عفونت‌های باکتریایی با عوامل ضد میکروبی جدید باشند (Riyanti *et al*, 2009).

میکروارگانیسم‌هایی که آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید می‌کنند به طور وسیعی در طبیعت پراکنده شده‌اند و نقش مهمی را در جمعیت میکروبی خاک، آب، فاضلاب و مواد در حال فساد بر عهده دارند. یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های میکروارگانیسم‌ها که تولید کننده قسمت اعظم آنتی‌بیوتیک‌ها در طبیعت هستند اکتینومیست‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها ساپروفیت‌های رشته‌ای گرم مثبتی هستند که به طور وسیعی در خاک، آب و گیاهان پراکنده می‌باشند و به عنوان یکی از بزرگ‌ترین جمعیت‌های باکتری‌های خاکزی شناخته می‌شوند. اکتینومیست‌ها تولید کننده تعداد زیادی از ترکیبات اساسی و حیاتی برای سلامتی انسان از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، تنظیم کننده‌های ایمنی، مهارکننده‌های آنزیمی، ترکیبات ضد توموری و ویتامین‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها در چرخه مواد آلی، تولید مواد غذایی و در صنایع داروسازی، کشاورزی و ماهیگیری نقش مهمی را ایفا می‌کنند(Usha, 2010 and Mohitosh Biswas *et al* 2011 .

انتروکوک‌ها به طور معمول جزء فلور طبیعی مجاری روده ای، دهان و مجاری تناسلی انسان و حیوانات می‌باشند و به صورت همزیست و یا با بیماری‌زایی بسیار پایین زندگی می‌کنند.

دو دهه قبل عفونت‌های انتروکوکی در مواردی شامل عفونت‌های مجاری ادراری، جراحت‌های ناشی از سوختگی، برش‌های جراحی و دریچه‌های قلبی بسیار افزایش یافت. این عفونت‌ها بر روی وسایل مورد استفاده در پزشکی و جراحی کلونیزه شده و منجر به ایجاد اندوکاردیت و سپتی سمی در بیماران می‌شوند. دست کم ۱۲ گونه از انتروکوک‌ها در ارتباط با بیماری‌های گوناگون شناسایی شده‌اند (Cosmina zeana *et al*,200).

دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم در دهه‌های اخیر به عنوان عامل اصلی عفونت‌ها شناخته شده‌اند که در این میان فکالیس مسئول بیش از ۸۰ تا ۹۰٪ عفونت‌های ناشی از این جنس می‌باشد(Fischetti and Ryan, 2009) .

یکی از دلایل اهمیت عفونت‌های انتروکوکی مقاومت آن‌ها نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. انتروکوک‌ها به طور ذاتی به سفالوسپورین‌ها، پنی‌سیلین‌های مقاوم نسبت به پنی‌سیلیناز و مونوباکتام‌ها مقاوم هستند. آن‌ها نسبت به بسیاری از آمینوگلیکوزیدها، مقاومت داخلی کم و نسبت به فلوروکینولون‌ها حساسیت یا مقاومت متوسطی دارند. همچنین نسبت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین

کمتر از استرپتوکوک‌ها حساس هستند. انتروکوک‌ها توسط ß- لاکتام‌ها مانند آمپی‌سیلین مهار می‌شوند اما معمولاً توسط آن‌ها کشته نمی‌شوند.(Barbara E.Murray *et al*,2000)

یونگ ری که به دنبال جداسازی جدایه ای از اکتینومیستها بود ,که بتواند مولد ماده ی ضد میکروبی برعلیه VRE باشد, موفق به جداسازی وشناسایی جدایه ی استرپتومیسس KH-614 , شد که مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE بود.او این کار رادر سال ۲۰۰۲ در کشور کره انجام داد. برای جداسازی این باکتری از S medium وAv medium استفاده نمود.در پی انالیز هایی که روی ماده ی حاصل از محیط کشت مایع این جدایه انجام شد به این نتیجه رسید که ماده ی حاصله علاوه بر این که فعالیت ضد میکروبی دارد , فعالیت انتی توموری هم دارد(Ki-Hyeong Rhee et al,2002).

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه های خاک:

جمع آوری نمونه های خاک از زمین های زراعی استان قم با استفاده از بیلچه ی باغبانی انجام شد. به این صورت که ابتدا لایه ی سطحی خاک را کنار زده شد واز عمق ۱۵-۵ سانتی متری عمل نمونه گیری صورت گرفت.نمونه ی خاک بلافاصله درونوپوشش گیاهی منطقه و شماره ی نمونه بر روی پلاستیک مربوطه ثبت گردید.ونمونه ها در اسرع وقت به ازمایشگاه انتقال داده شدودر یخچال نگه داری شدتا مراحل بعدی روی انها صورت گیرد(M.Kavya *et al*.,2012) .

استفاده از تیمار caco3 :

مقدار g ۱ از نمونه ی خاک را وزن نموده , سپس آنرا در لوله ی شیشه ای در پوش دار واستریل ریخته وسپس به آن g ۰/۱ caco3 اضافه کرده, آنرا مخلوط کرده ودر دمای ۲۸ درجه ی سانتی گراد به مدت ۵ روز انکوبه گردید (Tara Devi Gurung et al.,2009).

مقدار g ۱۰ خاک رابه ارلن ۵۰۰ میلی لیتر که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل است, اضافه گردید, سپس ارلن به مدت یک ساعت در دمای ۲۸ درجه ی سانتیگراد و rpm ۲۰۰ شیک گردید.از هر نمونه ی خاک ۱میلی لیتر از سوسپانسیون خاک به اولین لوله ی تهیه رقت اضافه شد وبعد از شیک کردن دوباره ۱ میلی لیتراز لوله ی اول به لوله ی دوم اضافه شد این کار تا لوله ی پنجم انجام شد.با این روش رقت های سریالی تهیه شد(M.Kavya et al.,2012).

انجام کشت اولیه با روش Spread plate method:

۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به پلیت های حاوی محیط GYEوISP4 انتقال داده شد وبا میله ی شیشه ای سر کج استریل بر روی کل سطح آگار پخش شد سپس محیط های کشت به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد , انکوبه شد, تا بررسی های بعدی روی آن ها صورت گیرد.(M.Kavya et al.,2012)

شناسایی کلنی های اکتینومیست:

با مشاهده ی پلیت ها, کلنی هایی که دارای ظاهر پودری یا گچی و به رنگ های سفید , خاکستری, قرمز , زرد, آبی وبنفش بودند, انتخاب گردیدند. سپس رنگ آمیزی گرم از این کلنی ها انجام شد.میکرو اورگانیسم هایی که زیر میکروسکوپ دارای ویژگی های اکتینومیست ها(گرم مثبت وآرایش رشته ای) بوده را ,علامت گذاری کرده وبعد این کلنی ها به محیط کشت ISP2 انتقال داده ش (M.Kavya et al.,2012).

تهیه ی کشت خالص از کلنی های اکتینومیست:

کلنی هایی که با توجه به مطالعه ی میکروسکوپی به عنوان اکتینومیست منتخب بودند, روی محیط ISP2 به صورت خطی کشت داده شدند و پس از ۷ روز انکوباسیون در ۲۸ درجه ی سانتی گراد , باپیچیدن پارافیلم به دور پلیت ها در یخچال نگه داری شدند تا برای بررسی های بعدی آماده باشند.(M.Kavya et al.,2012)

انتروکوک مقاوم به ونکومایسین VRE :

جدایه ی استاندارد انتروکوک مقاوم به ونکومایسین ATCC 51299 از ازمایشگاه رفرانس تهیه گردید.

ارزیابی جدایه ها از نظر تولید ماده ی ضد میکروبی:

جدایه ی اکتینومیست جدا سازی شده به صورت دایره ای روی محیط کشت Hickey-trenser agar medium , کشت داده شدسپس پلیت ها در دمای ۲۸ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند.سپس لوله های حاوی محیط BHI براث , انتروکوک مقاوم به ونکومایسین , روی پلیت های قبلی اضافه شد.(کدورت ایجاد شده در لوله های محیط مایع برابر با لوله ی۰/۵ مک فارلند تهیه شده بود)بعداز۴۸-۲۴ ساعت نتایج ثبت گردید.(Alireza Dehnad et al.,2010)

انجام تست های بیوشیمیایی روی جدایه منتخب:

تست هایی که برای شناسایی جدایه E.P2 انجام شدند عبارتند از:تولید پیگمان ملانین, هیدرولیز نشاسته, تجزیه توئین ۸۰ , تست لیستیناز, احیای نیترات , تست اکسیداز , تست کاتالاز , تست DNase , هیدرولیز تریپتوفان , رنگ آمیزی اسید پایدار و مقاومت به لیزوزیم(Houssam M.Atta ,2009).

بررسی خاصیت ضد انتروکوکی محلول رویی محیط کشت شده با جدایه منتخب :

پس از کشت جدایه استرپتومیست مورد نظر روی محیط کشت ISP4 اسلنت وگرماگذاری به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه ی سانتی گراد, سوسپانسیون اسپوری از میکرواورگانیسم تهیه شد .برای این کار مقدار ۱۰ میلی لیتراب مقطر استریل را تهیه نموده وپس از اضافه نمودن اب مقطر استریل به لوله ی حاوی محیط کشت اسلنت ,سطح کلنی ها با فیلدوپلاتین کمی خراش داده شد سپس به مدت چند دقیقه شیک شد ومقدار ۱ میلی لیتراز سوسپانسیون اسپوری استرپتومیسز به محیط کشت مایع اضافه شد (محیط کشت مایع که همان محیط تخمیر می باشد در ارلن هایی به حجم ۲۵۰ میلی لیترکه حاوی ۵۰ میلی لیترمحیط کشت بود تهیه شده بود.)سپس ارلن حاوی محیط کشت مایع در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ , ۱۷۰ و۲۰۰ در دمای ۲۸ درجه ی سانتی گراد گرماگذاری گردید.هرروز به فاصله ی زمانی ۲۴ ساعت مقداری از مایع تخمیر را در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی حاصله رابه درون چاهک هایی که از قبل روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شده با جدایه ی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین ,ایجاد شده بود, تزریق شد.ودر دمای ۳۰ درجه ی سانتی گراد گرماگذاری شد سپس از نظر هاله ی عدم رشد بررسی شد Mohamed (E.osman et al.,2011).

ابتدا محیط کشت MHA در پلیت تهیه شد,بعد ۱ میلی لیتراز سوسپانسیونی برابر با لوله ی ۰/۵ مک فارلند , از جدایه ی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین که از قبل تهیه شده بود, روی پلیت ها پخش شد.سپس ۲۰ میکرو لیتر از مایعی که حاوی ماده ی آنتی میکروبیال بود(در مرحله ی قبل تهیه شده بود), روی دیسک ها تزریق شد.وبعد از گرماگذاری در ۲۸ درجه ی سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت , نتایج بررسی شد(M.Kavya et al.,2012).

شناسایی ماده موثره بازدارنده رشد انتروکوک:

سپس انرا به محیط مایع مناسب تلقیح کرده و۷ روز در , ابتدا سوسپانسیون اسپوری از جدایه ی استرپتومیسز تهیه شد سپس مقداری از محیط مایع را در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به ,انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه و دور ۲۰۰ قرار داده شد

مدت ۱۵ دقیقه قرار داده ومایع رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد.سپس مقدار مساوی از مایع رویی واتیل استات را در قیف دکانتور مخلوط کرده وفاز آلی جدا گردید.با استفاده از تیوسولفات سدیم عمل آبگیری انجام شدومایع حاصل از کاغذ بدست آمده جهت انجام (TRB-5MS :Columnصافی عبور داده شد. ومایع

Length: 30 m

Internal diameter: 250 micrometer

Film thickness: 0.25 micrometer

carrier gas : helium

Flow: 1 mL/min

GC : HP 6890

MSD: 5973)

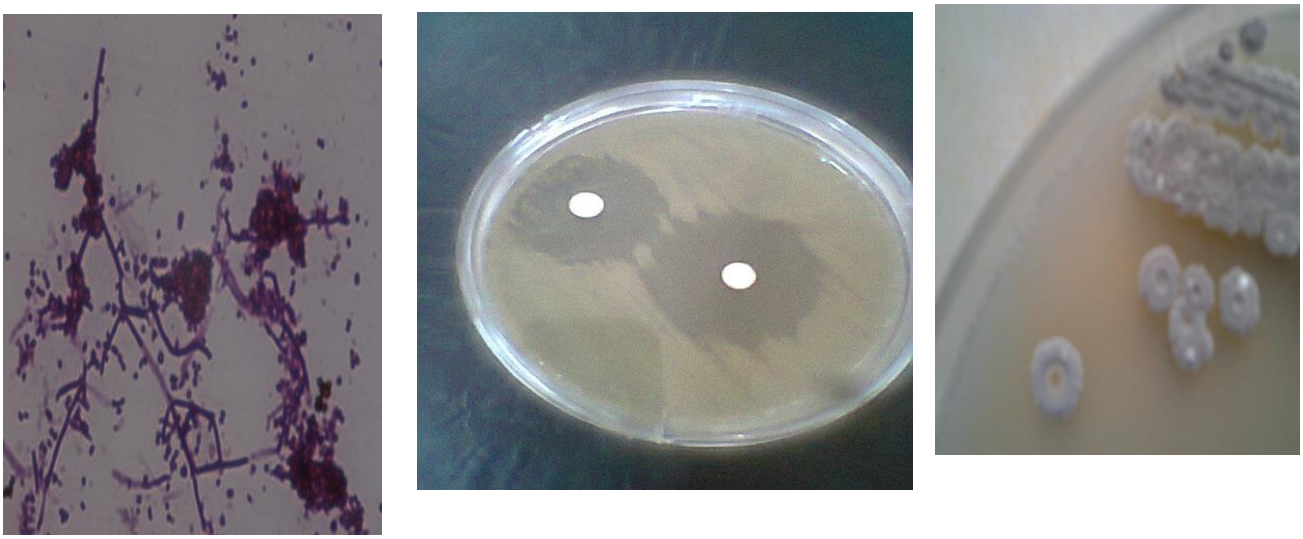
GC-MS analysis به ازمایشگاه دانشگاه شریف ارسال گردید(Mostafa Y.El –Naggar et al,2006).

نتایج

از خاک های زراعی شهر قم ۱۲۵ جدایه اکتینومیست بدست آمد.۵ جدایه خاصیت بازدارندگی رشد انتروکوک مقاوم به , ونکومایسین رانشان دادند.جدایه ای که برترین اثر بازدارندگی رشد انتروکوک مقاوم به ونکومایسین را نشان داد مورد شناسایی قرار گرفت.

جدول۱: قطر هاله توقف رشد ایجاد شده علیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین توسط جدایه E.P2

جدایه ی اکتینومیست	اندازه ی هاله ی ایجاد شده در غربال گری اولیه بر حسب mm
E.P2	۲۶

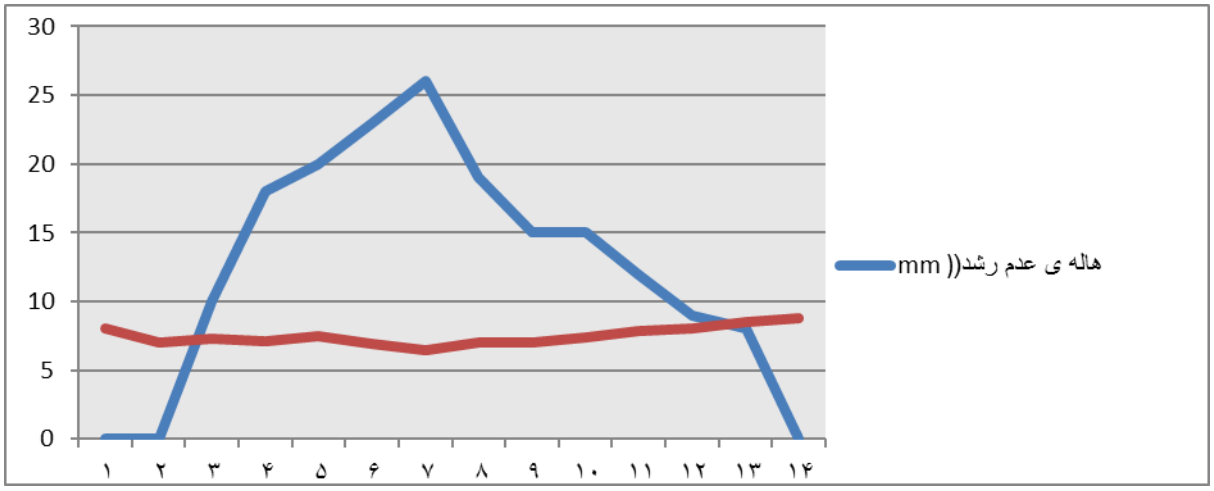


الف ب ج

شکل۱:در شکل الف مرفولوژی کلنی جدایه E.P2 روی محیط کشت ISP4 نشان داده شده است.در شکل ب هاله سمت راست مربوط به هاله عدم رشد ایجاد شده توسط جدایه E.P2 , بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین می باشد.در اینجا انتروکوک مقاوم به ونکومایسین روی کل محیط پخش شده است.ودیسک نشان داده شده ,حاوی ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع ۷ روزه جدایه E.P2 می باشد.در شکل ج رنگ آمیزی گرم جدایه E.P2 در زیر میکروسکوپ نوری نشان داده شده است.

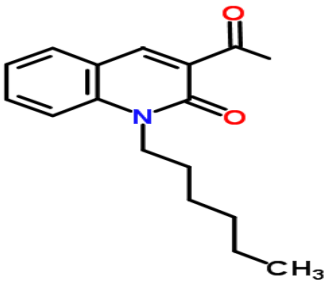
جدول ۲ : نتایج تست های بیوشیمیایی

تست های بیوشیمیایی	جدایه ی E.P2
تولید پیگمان ملانین	+
هیدرولیز نشاسته	+
تجزیه توئین ۸۰	–
تست لیستیناز	+
احیای نیترات	–
تست اکسیداز	–
تست کاتالاز	+
تستDNase	–
هیدرولیز تریپتوفان	+
رنگ آمیزی اسید پایدار	–
مقاومت به لیزوزیم	–



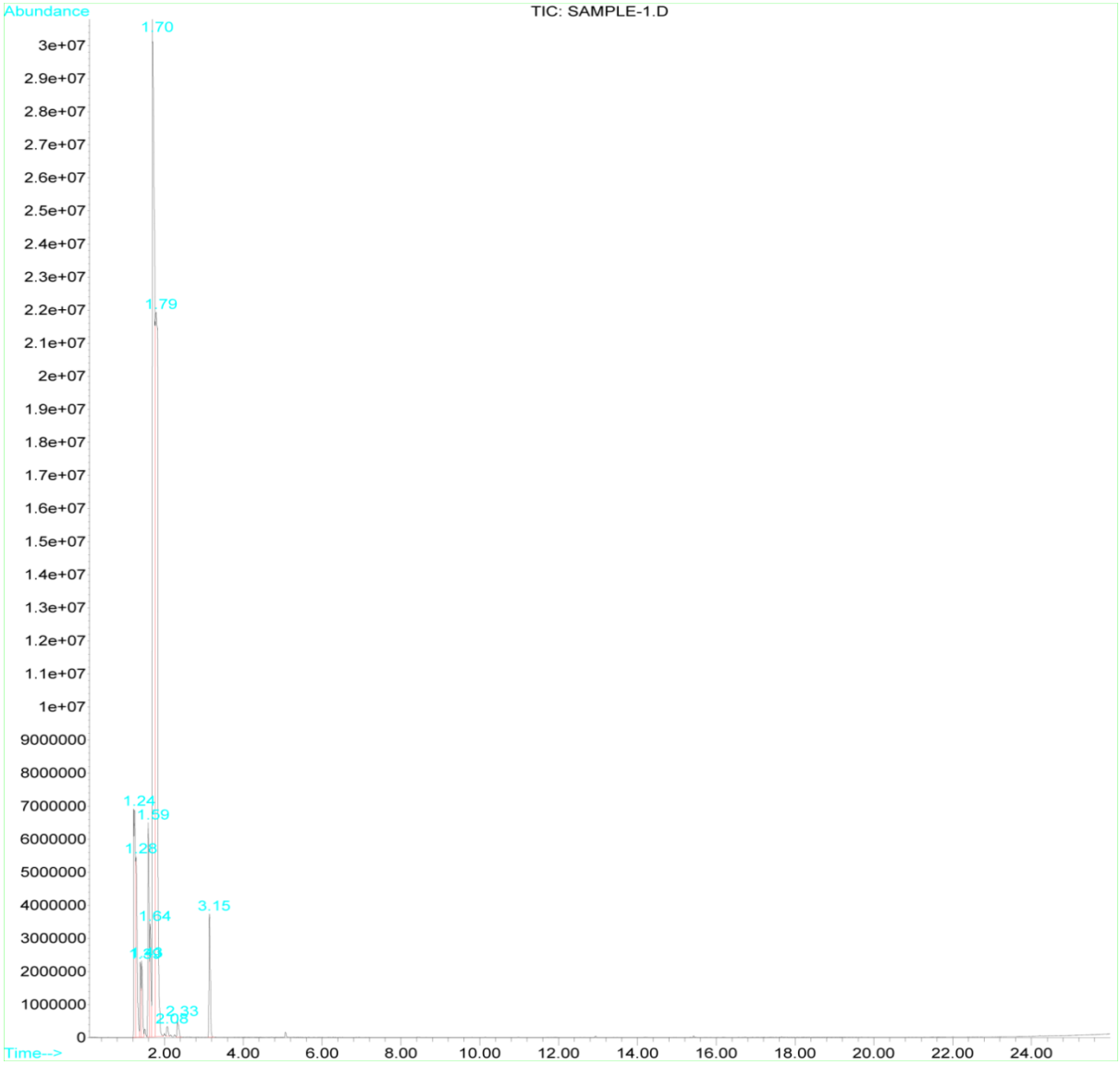
نمودار ۱: هاله ی عدم رشد ایجاد شده بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین و pH مربوطه طی ۱۴ روز در محیط کشت مایع جدایه E.P2

با بررسی نمودار های حاصل از آنالیز GC-MS مایع حاوی ماده موثرهاز محیط کشت مـایع جدایـهE.P2 بـر علیـه انتروکـوک مقاوم به ونکومایسین , ماده ضد میکروبی حاصـله اینگونـه نـام گـذاری شـد:-3-Quinoline Carboxylic acid,1-hexyl 1,2-dihydro-2-oxo



شکل ۲: ساختار شیمیایی ماده ضد میکروبی حاصل از محیط کشت مایع جدایه E.P2

نمودار ۲ مربوط به نتیجه آنالیز GC-MS محیط کشت مایع جدایه E.P2 مـی باشـد.در ایـن نمـودار پیـک مربـوط بـه مـواد موجود نشان داده شده است .بالاترین پیک مربوط به ماده ضد میکروبی حاصل از جدایه E.P2 .می باشد.استخراج این ماده از محـیط کشت مایع توسط حلال آلی اتیل استات صورت گرفت.



نمودار ۲ :نمودار حاصل از آنالیز GC_MS محیط کشت مایع جدایه E.P2

بحث ونتیجه گیری :

جدایه E.P2 از نظر توالی srRNA ۱۶ شباهت ۱۰۰٪ با Streptomyces Tendae دارد.

ماده ضد میکروبی حاصل از محیط کشت مایع جدایه E.P2 یک ترکیب کوئینولینی می باشد.

یونگ ری که به دنبال جداسازی جدایه ای از اکتینومیستها بود ,که بتواند مولد ماده ی ضد میکروبی برعلیه VRE باشد, موفق به جداسازی وشناسایی جدایه ی استرپتومیسز KH-614 , شد که مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE بود.او این کار رادر سال ۲۰۰۲ در کشور کره انجام داد. برای جداسازی این باکتری از S medium وAv medium استفاده نمود.در پـی انـالیز

هایی که روی ماده ی حاصل از محیط کشت مایع این جدایه انجام شد به این نتیجه رسید که ماده ی حاصله علاوه بر این کـه فعالیت ضد میکروبی دارد , فعالیت انتی توموری هم دارد(Ki-Hyeong Rhee et al,2002).

مصطفی ال نگار در سال ۲۰۰۷ موفق به جداسازی جدایه ی استرپتومیسز HAL64 , از خاک های مصر شد.ابتدا بـا توجـه بـه مرفولوژی و ساختار دیواره ی سلولی این استرپتومیسز , آنرا به عنوان جنس استرپتومیسز شناسایی کرد.سپس بـا انجـام آنـالیز سکانس ۱۶ s rRNA مشخص شد که این باکتری همان استرپتومیسز میباشد.این جدایه مولد ماده ی ضد میکروبـی قـوی بـر علیه باکتری های گرم مثبت بیماری زا بود.در صورتی که اثر این ماده ی ضد میکروبی بر علیه باکتری های بیمـاری زای گـرم منفی کمتر بود.آنتی بیوتیک تولید شده توسط این جدایه با سـیلیکاژل جـدا شـد سـپس بـا Sephadex LH-20 Column خالص سازی شد و در نهایت خلوص آنتی بیوتیک تولید شده بـا روش HPLC ثابـت گردید.سـاختار شـیمیایی آنتـی بیوتیـک خالص سازی شده با استفاده از آنالیز های اسپکتروسکوپیک , شناسایی شد.مشخص شدکه این آنتی بیوتیـک Kosinostatin میباشد.این آنتی بیوتیک یک کویینوسیکلین میباشد.این آنتی بیوتیک هـم چنـین توسـط میکرومونوسـپورا TP-A0468 نیـز تولید می شود(Mustafa El-naggar ,2007).

تشکر و قدر دانی

با تشکر از اقای محمد رضا زند منفرد به عنوان کارشناس آزمایشگاه شیمی وآقای علی جوادی به عنوان مسئول آزمایشگاه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی واحد قم که مرا در انجام این مطالعه یاری نمودند.

منابع

- Alireza Dehnad, Lalle parsa, Rouhollah Bakhshi, samad Abdi soofiani and Ahad Mokhtarzadeh, 2010. Investigation antibacterial activity of streptomycetes isolates from soil samples, west of Iran. African Journal of Microbiology Research vol. 4(14), pp: 1542 – 1549.

-Yehude Carmeli, George M. Eliopouloos, and Matthew H. samore, 2002. Antecedent treatment with different Antibiotic Agents as a risk factor for vancomycin – Resistant Enterococcus. Emerging infections Diseases. Vol. 8: 802 – 809.

-Riyanti, Jaka Widada, and ocky karma Radjasa, 2009. Isolation and Screening of Antimicrobial producing – Actinomycetes symbionts in Nudibranch. Indonesian journal of Biotechnlolgy, vol. 14, No. 1, pp: 1132 – 1138.

-Mohitosh Biswas, Md. Ajijur Rahman, MST. Hejera Khatun and Md. Anwar – ul Islam, 2011. Isolation and cherecterization of streptomyces sp. ANBS – 15 and Antimicrobial Activities of its secondary Metabolies. Bangladesh Pharmaceutical journal, Vol. 14, No. 1. p: 15 – 20.

Usha, P., Ananthaselvi, P., Venil, C and Palaniswamy, M. 2010. Antimicrobial and Antiangiogenesis activity of Streptomyces parvulus KUAP106 from Mangrove soil. European Journal of Biological Sciences. 2(4), 77-83.

-Cosmina zeana, Christine J. Kubin, Phyllis Della – Letta, 2001. Vancomycin – Resistant Enterococcus faeciumMeningitis successfully Managed with Linezolid: case Report and Review of the Literature, CIb: 477 – 82.

-Barbara E. Murray, M. D. ,2000. Vancomycin - Resistant Enterococcal infections. The new England journal of medicine, pp: 710 – 715.

Fischett, V and Ryan, P. The genus Streptococcus. Chapter 23. In: Goldman, E, and Green, L, editors. 2th ed. Taylor & Francis Group, New York, 2009. 295-307.

-M. Kavya Deepthi, M. Solomon sudhakar and M. Nagalakshmi Devamma, 2012, Isolation and Screening of streptomyces sp. From coringa Mangrove soils for Enzyme production and Antimicrobial activity. IJP CBS, 2 (1): 110 – 116.

-Tara Devi Gurung, Chringma Sherpa, vishwanath prasad Agrawal and Binod Lekhak, 2009. Isolation and characterization of Antibacterial Actinomycetes from soil samples of kalapathar Mount Everest Region. Nepal Journal of science and Technology 10, pp: 173 – 182.

-Houssan M. Atta, 2009. An Antifungal Agent Produced by streptomyces olivaceiscleroticus, Az – SH 514. World Applied science journal 6 (11): 1495 – 1505.

-Mohammad E. Osman Fath Allah H. Ahmad and Walla S. M. Abd El All, 2011. Antibiotic production from Local streptomyces Isolates from Egyptian soil at wedey El – Natron. Australian journal of Basic and Applied scieaces, 5: 1906 – 1910.

-Mostafa Y. El – Naggar, Samy A. El – Assar and sahar M. Abdul – Gawad, 2006. Meroparamycin production by newly Isolated streptomyces sp. Strain MARO 1: Taxonemy, Fermentation, Purification and structural Elucidation. The journal of Microbiology, p: 432 – 438.

El-Naggar, M.Y. 2007. Kosinostatin, a Major Secondary Metabolite Isolated from the Culture Filtrate of Streptomyces violaceusniger Strain HAL64. The Journal of Microbiology. 45(3), 262-267.

-Ki – Hyeong Rhee, 2002. Isolation and characterization of streptomyces sp. KH – 614 Producing anti VRE (Vancomycin – Resistant entrococci) antibiotics. J. Gen. Appl. Microbial. ,48: 321 – 327.