Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Isolation and screening of producing antibacterial compounds bacteria from the salt flats of Bardascan against Drug-Resistant pathogens

Hassan Bagheri Yazdi [1*], Hamed Norouzi Taheri [1], Hamidreza Vatanpour [2]

[1] Dept of Biology Education, Farhangian University, Tehran, Iran
[2] Dept of Science Education, Farhangian University,Tehran,Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Aug. 26, 2024
Received in revised form: Dec. 07, 2024
Accepted: Jan. 12, 2025
Published Online: Apr. 16, 2025

**** Correspondence to:***
Hassan Bagheri Yazdi
Dept of Biology Education, Farhangian University, Tehran, Iran

Email:
bagheriyazdi@cfu.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Diseases caused by drug-resistant bacteria such as methicillin-resistant Staphylococcus aureus are increasing in many medical centers around the world, and researchers are looking for new natural medicinal compounds to overcome and treat these bacteria. Therefore, the current study was conducted with the aim of investigating the antimicrobial effects of native Iranian salt desert bacteria from the environment with difficult growth conditions.

Materials & Methods: The isolates were separated and examined for morphology, followed by basic biochemical tests for bacterial identification. Antibacterial activity was assessed in two stages: primary screening via cross-culture and antimicrobial tests on selected active strain extracts using the disk diffusion method. Tests were repeated three times, and growth halo diameters were measured. Finally, the antimicrobial substance production of the selected strain was quantified against MRSA using the disk diffusion method.

Results: The study isolated 30 strains from Bardaskan salt flats, with 4 identified as active isolates. One strain, N2, demonstrated strong antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, with activity increasing with concentration. Maximum antimicrobial substance production occurred 54 hours into fermentation, creating a 29 mm non-growth halo. Data analysis was conducted using Microsoft Excel V.2020.

Conclusion: Considering the strong antimicrobial activity of the bacterial extract isolated from the salt Bardaskan against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by producing, purifying, and identifying the active compounds of these isolates on an industrial scale, the possibility of introducing new antimicrobial compounds is raised.

Keywords: Antibacterial Effect, Bacterial Extract, Drug Resistance, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

How to cite this paper: Bagheri Yazdi H, Norouzi Taheri H, Vatanpour H. Isolation and screening of producing antibacterial compounds bacteria from the salt flats of Bardascan against Drug-Resistant pathogens. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;33(1):40-54.

Introduction

TWith the increasing resistance of pathogens to antibiotic treatment, the need to provide appropriate solutions to combat the phenomenon of drug-resistant pathogens in the world is of great importance (1). This challenge has motivated researchers to search for and develop antibacterial compounds of natural origin (2). The emergence of drug resistance in strains of Staphylococcus aureus (MRSA) has caused serious problems in hospitals (2). Hospital infections of MRSA have become a major problem in the world due to drug resistance (5). Therefore, the need for new and effective drugs has become a major challenge in the pharmaceutical industry (8). Most of the drugs of chemical origin used in medicine have side effects; on the other hand, pharmaceutical compounds isolated from natural sources have fewer side effects. For this reason, the search for new drugs from natural environments is a priority for researchers (8). Among the bacteria isolated from the desert, Streptomyces produce more active compounds and have been introduced as a new source of biological metabolites in biotechnology and pharmaceuticals (13). Extensive studies are still

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

being conducted to obtain new active compounds from Actinomycetes with better effects and less toxicity to the host (13). The current study was conducted with the aim of investigating the antimicrobial effects of native Iranian salt desert bacteria from the environment with difficult growth conditions.

Methods

Samples were collected from the salt flat of Bardaskan City, located south of Rahmanieh village in Shahrabad district, and stored under appropriate conditions (5°C, dry) before being transported to the laboratory. A serial dilution method was employed to isolate and purify bacteria from the samples, which were cultured on Starch Casein Agar (SCA) medium for 10 days at 28°C. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains, previously isolated from clinical specimens in Mashhad and identified using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) method, were used as test pathogens.The isolates were initially screened against MRSA using the cross-streak method on nutrient agar medium, incubated at 28°C for 3 days. The isolate N2, showing the best antimicrobial activity, was selected for further analysis. It was grown in 1000 ml of liquid Actinomycete Isolation Medium to extract antibacterial substances. Fermentation was conducted at 30°C in a shaking incubator at 190 rpm for seven days, after which the microbial suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes to separate the supernatant. The sensitivity of MRSA strains to the crude extract of N2 was evaluated using the disk diffusion method. This method was employed to investigate the antimicrobial activity of substances produced by N2 at different stages of its growth under fermentation conditions. The study highlights the potential of desert soil isolates in producing antimicrobial compounds effective against resistant bacterial strains.

Results

5 desert soil samples were examined from each location. Bacterial colonies appeared after 7 to 14 days. From the different samples, 30 bacterial strains were isolated on the agar surface. To identify isolates active against drug-resistant pathogens, cross-streak screening was performed among 30 strains isolated from desert soil. The results indicated that all strains had antimicrobial activity against at least one pathogenic bacterium. Among these active isolates, 4 isolates with the best antimicrobial properties, namely N2, N15, N18, and N20, were selected for secondary screening and further work. Considering the stronger activity of the N2 isolate, it was decided to continue the next stages of the work only by working on this strain. The results indicated that the concentration of 0.5 µg/ml of the N2 extract against isolate number four (29±1.7) and MRSA (27±1.5) showed better activity than the antibiotic vancomycin (14±1.4). The highest amount of antimicrobial substance production in terms of growth inhibition zone was 54 hours after the start of fermentation, which created a growth inhibition zone of nearly 20 mm. The results show that the antimicrobial activity of the isolated crude extract was zero in the first 30 hours, and then up to 54 hours, along with bacterial growth, the amount of active metabolite production increased and reached a peak, and after that, the antimicrobial activity decreased and finally reached zero at 110 hours.

Conclusion

This study highlights the potential of indigenous strains from the desert region of Iran for the production of antimicrobial compounds against drug-resistant bacteria, particularly Staphylococcus aureus resistant to methicillin (MRSA). The antimicrobial activity of strain N2 was confirmed, showing its ability to inhibit the growth of this resistant pathogen. Furthermore, considering the strong antimicrobial activity of these isolates, there is potential for the development of new antimicrobial compounds through the production, purification, and identification of active compounds on an industrial scale. Therefore, further studies on these compounds could contribute to the development of effective new resources for combating drug resistance.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal Analysis, Investigation, Resources, Visualization and, Data Curation: HB, HNT, HV, Supervision: HB, Writing– Original Draft Preparation: HB, HN, HV, Writing– Review & Editing: HB, HN, Project Administration: HB.

Ethical Statement

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study was funded by Farhangian University (Iran).

Acknowledgment

This article is derived from a research project conducted at Farhangiyan University (Iran). The authors express their gratitude to as well as all the participants who contributed to the study.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه پاتوژن های مقاوم به دارو

حسن باقری یزدی [۱*]، حامد نوروزی طاهری [۱]، حمیدرضا وطن پور [۲]

[۱] گروه آموزش زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

[۲] گروه آموزش علوم تجربی ، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

نویسنده مسئول:
حسن باقری یزدی
گروه آموزش زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

Email:
bagheriyazdi@cfu.ac.ir

چکیده

مقدمه: بیماری های ایجاد شده به وسیله باکتری های مقاوم به دارو از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بسیاری از مراکز درمانی دنیا در حال افزایش است و پژوهشگران به دنبال یافتن ترکیبات دارویی طبیعی جدید برای مقابله با این باکتری ها می باشند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی باکتری های بومی کویر نمک ایران، با شرایط رشد افراطی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پس از نمونه گیری، جداسازی ایزوله ها انجام شد، بررسی مورفولوژی جدایه ها و تست های بیوشیمیایی اولیه برای شناسایی باکتری ها انجام شد. بررسی اثر ضدمیکروبی در دو مرحله صورت گرفت. ابتدا با روش کشت کراس یا کشت متقاطع غربالگری اولیه جدایه ها از نظر فعالیت ضدباکتریایی بررسی شد. در ادامه عصاره ایزوله منتخب فعال، جداسازی و خشک شد. تست ضدمیکروبی عصاره ها علیه سویه های مقاوم به دارو ، به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. هر آزمون سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و ثبت شد. در پایان میزان تولید ماده ضدباکتریایی ایزوله منتخب در واحد زمان با روش دیسک دیفیوژن علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تعیین گردید. آنالیز معنی داری داده ها و انحراف از میانگین با نرم افزار مایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۲۰ انجام شد.

یافته‌های پژوهش: از نمونه های کفه نمکی، تعداد ۳۰ ایزوله جداسازی و شناسایی اولیه انجام شد. در غربالگری اولیه ۴ جدایه به عنوان ایزوله فعال شناسایی شدند. نتایج مرحله دوم غربالگری ایزوله منتخب نشان داد که ایزوله های فعال جداشده، فعالیت ضدباکتریایی خوب علیه گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین داشتند. نتایج نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی جدایه N2، با افزایش غلظت عصاره خام، بیشتر می شود. نتایج همچنین نشان داد بیشترین مقدار تولید ماده‌ی ضدمیکروبی بر حسب هاله عدم‌رشد ۵۴ ساعت پس از شروع فرمنتاسون می‌باشد که هاله‌ی عدم‌رشدی برابر با ۲۹ میلی‌متر علیه MRSA ایجاد کرده‌است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به فعالیت ضدمیکروبی قوی عصاره ایزوله منتخب از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با تولید، خالص سازی، و شناسایی ترکیبات فعال این ایزوله ها در مقیاس صنعتی، امکان معرفی ترکیبات ضدمیکروبی جدید مطرح خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، عصاره باکتری، مقاومت دارویی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

استناد: باقری یزدی حسن، نوروزی طاهری حامد، وطن پور حمیدرضا. جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی از کفه نمکی شهرستان بردسکن علیه پاتوژن های مقاوم به دارو. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، فروردین ۱۴۰۴؛ (۱)۳۳ : ۵۴-۴۰.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

با افزایش مقاومت پاتوژن ها به درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز به ارائه راهکار مناسب برای مقابله با پدیده پاتوژن‌های مقاوم به دارو در جهان از اهمیت زیادی برخوردار است (۱، ۲). این چالش باعث ایجاد انگیزه ای برای جستجو و ارایه ترکیبات ضد باکتریایی با منشاء طبیعی برای محققان فراهم آورده است (۳، ۴). در دنیا ترکیبات فعال با منشاء طبیعی به منظور درمان برخی بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های عفونی، اسهال، تب، سرماخوردگی و بهداشت دهان و دندان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید در درمان بیماری‌ها، به‌خصوص مقابله با پاتوژن‌های مقاوم به دارو، باکتری‌های کویر به عنوان منبع جدید با پتانسیل بالا در تولید متابولیت‌های فعال، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵، ۶، ۷). بروز مقاومت دارویی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوک باعث بروز مشکلات جدی در بیمارستان ها شده‌است. عفونت های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به علت مقاومت دارویی به یک مشکل عمده در جهان تبدیل شده‌است. لذا نیاز به داروهای جدید و موثر به یک چالش اصلی، در صنعت داروسازی تبدیل شده‌است اغلب داروها با منشا شیمیایی مورد استفاده در علم پزشکی دارای اثرات جانبی هستند از طرفی ترکیبات دارویی جدا شده با منشا طبیعی اثرات جانبی کمتری دارند. به همین دلیل جستجو برای داروهای جدید از محیط های طبیعی اولویت پژوهشگران می باشد(۸، ۹).

ترکیبات جداشده از میکروارگانیسم‌ها از گذشته تا به امروز مورد توجه بوده‌است و مطالعات زیادی برای استفاده از این ترکیبات در درمان بیماری‌های عفونی انجام شده است. متابولیت های ثانویه زیادی توسط میکروارگانیسم‌های شرایط سخت (اکسترموفیل) تولید می‌شود که در این بین باکتری های کویر قابلیت بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی فعال دارند (۱۰، ۱۱). تعداد زیادی از این ترکیبات تولید شده توسط اکسترموفیل های کویر به عنوان منابع جدید دارویی درنظر گرفته می‌شوند (۴).

در بین باکتری های جداشده از کویر ، استرپتومایسس‌ها ترکیبات فعال بیشتری تولید می‌کنند و به عنوان یک منبع جدید از متابولیت‌های زیستی در بیوتکنولوژی و داروسازی معرفی شده‌اند(۱۳، ۱۴). هنوز هم مطالعات گسترده‌ای برای به‌دست آوردن ترکیبات فعال جدید از اکتینومیست‌ها با اثرات بهتر وسمیت کمتر بر میزبان، درحال انجام است (۱۶و۱۵)

با توجه به موارد فوق تحقیقات پیوسته برای کشف ترکیبات جدید ضدمیکروبی علیه باکتری های مقاوم به دارو ادامه دارد. یکی از منابع مهم دارو، سویه های باکتریایی بومی ایران هستند که در پژوهش های مختلف بررسی شده است. در کشور ما مطالعات زیادی برای جداسازی ترکیبات باکتری با فعالیت ضد میکروبی از مناطق مختلف گزارش شده است. اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای روی باکتری های کفه نمکی شهرستان بردسکن با هدف بررسی اثرات ضدباکتریایی علیه پاتوژن های مقاوم به دارو صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق جداسازی و غربالگری باکتری های تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی از کفه نمکی با فعالیت ضدباکتریایی، علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و تعیین نقطه بهینه تولید ترکیبات ضدمیکروبی می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

جمع آوری نمونه از کفه نمکی شهرستان بردسکن با موقعیت جغرافیایی ۱۲ کیلومتری جنوب روستای رحمانیه در بخش شهرآباد که از سطح دریاهای آزاد ۸۰۵ متر ارتفاع و وسعت تقریبی ۷۸۸۸ هکتار که با جهتی شمال شرقی ـ جنوب غربی در جنوب شهرستان بردسکن واقع شده انجام شد. تعداد ۳ ایستگاه نمونه برداری تعیین گردید. نمونه ها پس از برداشت، در شرایط مناسب (دمای ۵ درجه و خشک) نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی و خالص سازی باکتری

جهت جداسازی و خالص سازی جدایه‌ها از نمونه های کویر، از روش سریال رقت استفاده شد. یک لوپ از هر نمونه در محیط کشت استارچ کازئین آگار (SCA)که

محتوی ۱۵ گرم آگار، ۱۰ گرم نشاسته محلول، ۲ گرم پتاسیم فسفات، ۲ گرم پتاسیم نیترات، ۲ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم کازئین، ۰/۰۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۰۲ گرم کلسیم کربنات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه در pH ۷/۵= می‌باشد، به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه کشت داده شدند. پس از رشد، خالص سازی کلنی ها در همین محیط کشت انجام شد. برای مراحل بعد کلنی های خالص هر ایزوله در سطح شیب‌دار همین محیط کشت رشد داده و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند (۱۵).

تهیه سویه های تست میکروبی

در این پژوهش از سویه‌های استاندارد شامل سالمونلا تیفی ATCC 3311، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591، سودوموناس آئروجینوزا ATCC 2108 ، کلبسیلا پنومونیه ATCC۷۰۰۶۰۳ اشریشیا کولی ATCC۲۵۹۲۲ باسیلوس سوبتلیس ATCC 2118 توسط آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی مشهد استفاده شد. سویه‌ها در محیط کشت نوترینت‌آگار (مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و جهت انجام مراحل بعدی استفاده شدند.

باکتری های مقاوم مورد استفاده سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بود که از نمونه های بالینی و از بیماران در شهر مشهد جدا شده بودند. این باکتری ها در پژوهش های قبل با استفاده از روش موسسه استاندارد های کلینیکی و آزمایشگاهی (CLSI) شناسایی و به بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انتقال یافت (۱۳).

بررسی اثرات ضدمیکروبی سویه ها

غربالگری اولیه جهت شناخت ایزوله های فعال

برای غربالگری اولیه ایزوله ها علیه پاتوژن‌ها از روش کشت متقاطع استفاده شد. بدین‌صورت که هر سویه در مرکز پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار به‌صورت یک خط مستقیم کشت داده شد و بعد پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد گرماگذاری شدند. سویه‌های بیماریزا مورد مطالعه به‌صورت یک خط عمود بر خط اصلی، کشت داده شدند. پلیت‌ها مجددا به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، گرماگذاری شدند. سپس هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. بهترین سویه‌ها از نظر فعالیت ضدباکتریایی برای مرحله بعد انتخاب شدند (۱۴و۱۲).

استخراج متابولیت‌های ایزوله منتخب

یکی از ایزوله های منتخب (N2) که دارای بهترین فعالیت در مرحله‌ی غربالگری اولیه بود جهت استخراج متابولیت‌های ضدباکتریایی، در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Actinomycete Isolation Medium (شامل ۱۵ گرم آگار، ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازئینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم منزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) کشت داده شدند (۱۲). برای تولید ترکیبات ضدمیکروبی، ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردار با سرعت ۱۹۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند. پس از هفت روز، سوسپانسیون میکروبی با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس مایع بالایی جداسازی شد. با توجه به حلالیت ترکیبات ضدمیکروبی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدباکتریایی از حلال آلی اتیل‌استات استفاده شد (۱۶). برابر حجم سوپرناتانت استخراج شده از هر سویه، اتیل‌استات به آن اضافه شد. فاز آلی دارای ترکیبات فعال، توسط دکانتور جدا و به کمک روتاری تغلیظ شد. سپس عصاره خشک شد و از عصاره‌ی خام استخراج‌شده برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های مقاوم به دارو استفاده شد (۱۷).

اثرات ضد باکتریایی عصاره خام سویه منتخب علیه پاتوژن مقاوم به دارو

برای تعیین حساسیت سویه های باکتری مقاوم نسبت به عصاره خام سویه N2 از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از سویه های MRSA سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند1.5×108 cfu/ml-1 تهیه شد و کشت چمنی بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار داده شد. در ادامه ۴۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره خام باکتری (۰.۵ تا ۰.۱ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شده بر روی

دیسک کاغذی بلانک (پادتن طب) قرار داده شد. دیسک ها پس از خشک شدن با فاصله معین بر روی پلیت ها قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. در نهایت قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش میلی متری در سه جهت اندازه گیری و ثبت گردید. در این تست از دیسک حاوی اتیل استات (حلال عصاره) به عنوان کنترل منفی و ونکومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای حصول اطمینان این آزمایش برا ی هر سویه باکتری سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله در سه بار به عنوان قطر نهایی ثبت شد (۱۵-۱۸).

تولید ماده ضدمیکروبی در واحد زمان

اندازه‌گیری مقدار تولید ماده ضدمیکروبی در زمان‌های مختلف رشد باکتری N2 در شرایط فرمانتاسیون با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن بر روی باکتری MRSA بررسی شد. ابتدا از سوسپانسیون سویه N2 که ۲۴ ساعت رشد کرده‌اند به محیط کشت فرمانتاسیون (شامل ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازئینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم منزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) به‌میزان ۵٪ حجم کل تلقیح شد. ارلن فاقد باکتری تلقیح‌شده به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شد. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. در طول این مدت در بازه‌های زمانی ۸ ساعته از ارلن‌ها در شرایط استریل نمونه‌گیری شد و پس از سانتریفیوژ، از مایع بالایی بر روی باکتری MRSA تست ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. هر تست با سه‌بار تکرار صورت گرفت و ارتباط تولید ماده ضدمیکروبی با رشد باکتری در واحدزمان به‌صورت یک نمودار گزارش شد (۲۰-۱۹). در این پژوهش آنالیز های آماری لازم به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

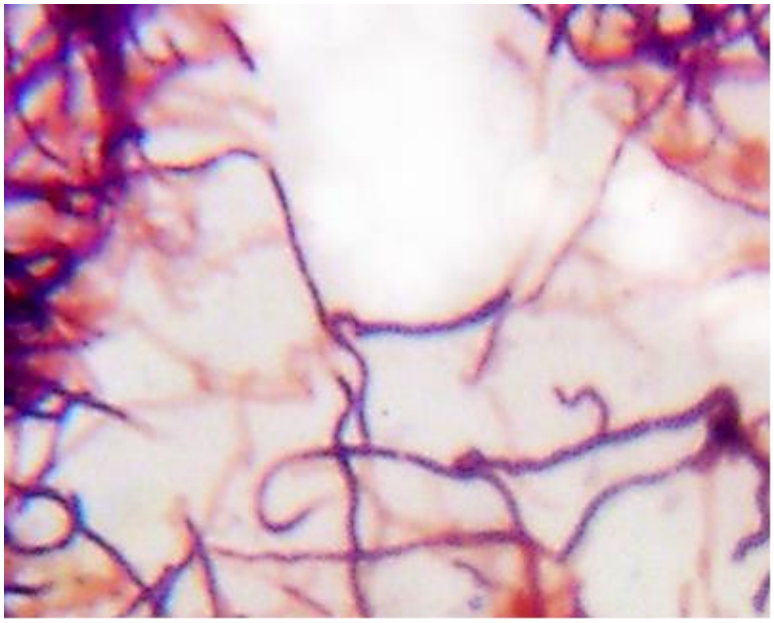
یافته‌های پژوهش

جداسازی و خالص سازی جدایه ها:

در این پژوهش از هر نقطه، تعداد ۵ نمونه خاک کویر بررسی شد. کلنی‌های باکتری پس از ۷ تا ۱۴ روز نمایان شد. از بین نمونه های مختلف، تعداد ۳۰ سویه باکتری، در سطح آگار جداسازی شدند. رنگ پشت و روی کلنی، سطح کلنی، شکل میکروسکوپی و دیگر خصوصیات مرفولوژیکی کلنی‌ها بررسی شد. سویه‌های N2,N12,N18 N20, و N25 اسپور تولید کرده و بقیه‌ی سویه‌ها اسپور تولید نمی‌کنند (جدول ۱). در شکل ۱ نتایج رنگ آمیزی سویه و بررسی میکروسکوپی و اسپورها در شکل ۲ نشان داده شده است. شکل ۳ نتایج فعالیت آنزیمی سویه منتخب را نشان می دهد.

جدول شمارهٔ ۱. ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ایزوله های اسپورزا

نام‌سویه‌ها	وضعیت اسپور	شکل انشعابات اسپور	رنگ پشت کلنی	رنگ سطح کلنی	آزمایش پروتئاز	آزمایش آمیلاز	آزمایش کاتالاز	تولید پیگمان
N2	منفرد	Simple (rectus)	سفید	خاکستری	+	–	+	+
N12	زنجیره‌ای	Simple (retinaculum-apertum)	طوسی	سفید	+	+	+	+
N18	منفرد	Simple (rectus)	سفید	طوسی	+	+	+	+
N20	زنجیره‌ای	Vertiiucllate (Monoverticillus)	سفید	خاکستری	+	+	–	+
N25	منفرد	Simple (Rectus)	خاکستری	طوسی	–	+	+	+



شکل شماره ۱. رنگ آمیزی و تصویر میکروسکوپی جدایه N2 جداشده از خاک کویر

شکل شماره ۲. جدایه N2 جداشده از خاک کویر: رنگ و شکل کلنی رشد کرده روی محیط کشت اختصاصی SCA

شکل شماره ۳. تست پروتئاز ایزوله N2 جداشده از خاک کویر

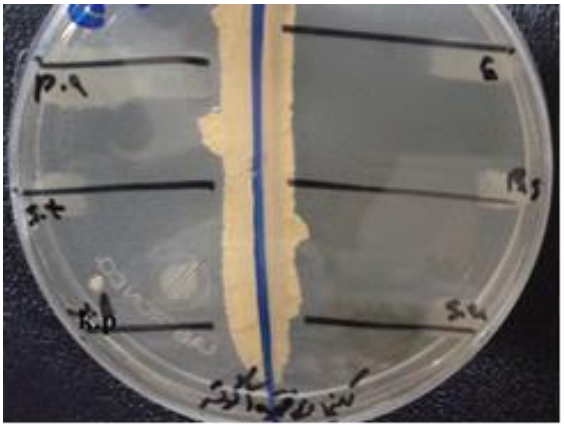
غربالگری اولیه جهت شناخت جدایه‌های فعال

برای شناسایی ایزوله های فعال علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، از بین ۳۰ سویه‌ی جداشده از خاک کویر، غربالگری باروش Cross Streak انجام شد (شکل ۴). نتایج نشان داد همه سویه‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه حداقل یک باکتری پاتوژن بودند. نتایج فعالیت ضد باکتریایی حاصل از غربالگری اولیه در جدول ۲ نشان داده شده‌است. از بین این جدایه‌های فعال، تعداد ۴ جدایه با بهترین خاصیت ضدمیکروبی به نام‌های N2، ، N15، N18 وN20 برای غربالگری ثانویه و ادامه‌ی کار انتخاب شدند. با توجه به فعالیت قوی تر جدایه N2 تصمیم گرفته شده مراحل بعدی کار تنها با کار روی این سویه ادامه پیدا کند (۱۳).

جدول شمارهٔ ۲. غربالگری اولیه ایزوله های جداشده از خاک کفه نمکی با روش cross-streak

Isolates	Test bacteria					
	E. coli	*B. subtilis*	*K. pneumonia*	*S. aureus*	*S. typhi*	*P. aeruginos*
N1	-	+	_	+	_	+
N2	+	+	+	+	+	+
N3	-	+	+	-	+	+
N4	+	-	_	+	_	+
N5	+	+	_	+	_	-
N6	-	+	_	+	_	+
N7	-	+	_	+	_	+
N8	+	+	_	+	_	+
N9	-	+	_	+	_	+
N10	-	+	_	+	_	+
N11	+	+	+	+	+	+
N12	+	+	+	+	+	-
N13	+	-	+	+	+	+
N14	+	+	+	-	+	+
N15	+	+	+	+	+	-
N16	+	+	+	+	+	+
N17	+	-	-	+	-	+
N18	+	+	+	+	+	+
N19	-	-	+	-	-	+
N20	+	+	+	+	+	+
N21	-	-	+	+	+	-
N22	+	-	+	-	-	-
N23	-	-	-	+	-	+
N24	+	+	+	-	+	+
N25	-	-	-	+	+	-
N26	-	+	+	+	+	+
N27	+	+	+	+	-	-
N28	+	+	-	+	+	+
N29	+	+	+	-	-	-
N30	-	+	-	+	-	-

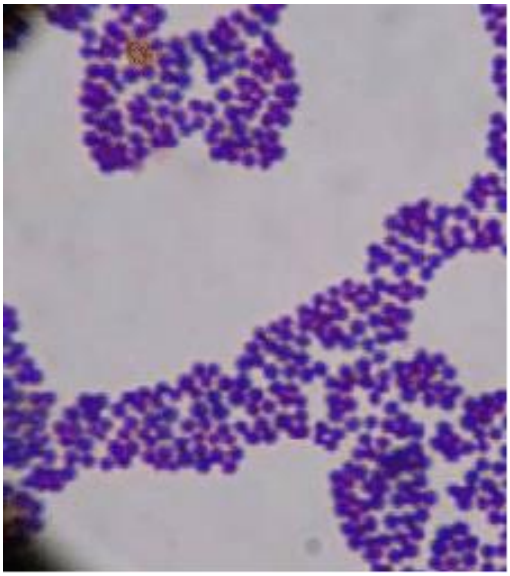
(+) دارای تاثیر و (-) فاقد تاثیر ضد باکتریایی



شکل شماره ٤. تصویر غربالگری اولیه جدایه N2 جداشده از خاک کویر

مورفولوژی سویه مقاوم به دارو

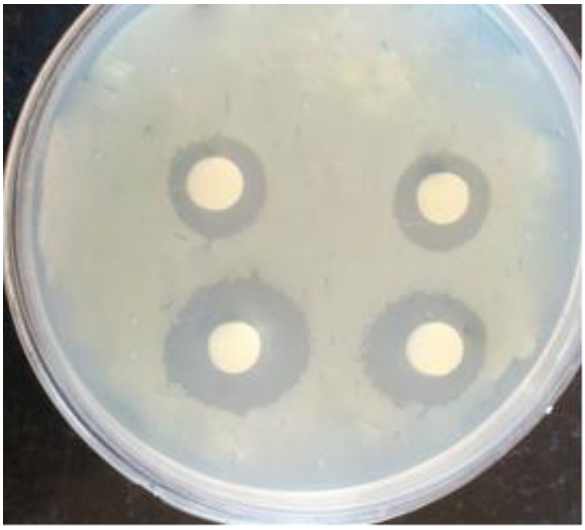
وضعیت مورفولوژی کلنی ها و شکل میکروسکوپی سویه های مقاوم به دارو با روش کمک رنگ آمیزی گرم با کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. با بررسی نتایج مشخص شد که سویه ها، متعلق به سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و خالص می باشند و مورد تایید بخش کنترل کیفی قرار گرفت(شکل ۵).



شکل شماره ۵. شکل باکتری مقاوم به دارو در زیر میکروسکوپ نوری

فعالیت عصاره خام ایزوله N2 علیه استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام جدایه منتخب با استفاده از روش دیسک دیفیوژن علیه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و ۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از بیماران بررسی شد (شکل ۶). نتایج نشان داد غلظت ۰/۵میکروگرم برمیلی لیتر عصاره علیه ایزوله شماره چهار (۱/۷±۲۹) و MRSA (۱.۵±۲۷) فعالیت بهتری نسبت به آنتی بیوتیک وانکومایسین (۱±۱۴/۴) و سایر غلظت ها نشان دادند (جدول ۳).



شکل شماره ٦. فعالیت ضدمیکروبی جدایه منتخب علیه MRSA

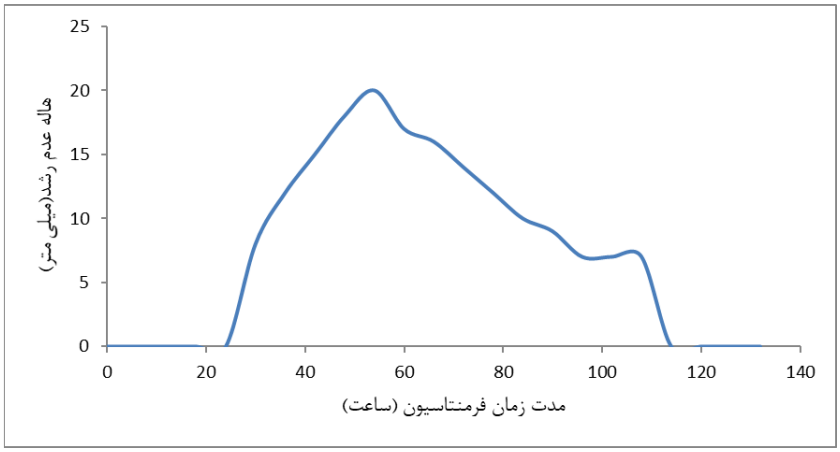
جدول شمارهٔ ۳. فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام ابزوله منتخب علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از بیماران به روش دیسک دیفیوژن

باکتری‌های تست شده	هاله عدم رشد برحسب میلی متر						
	غلظت ۰.۵	غلظت ۰.۴۰	غلظت ۰.۳۰	غلظت ۰.۲۰	غلظت ۰.۱۰	کنترل منفی	کنترل مثبت
MRSA	۲۶±۱/۵	۲۲±۱.۲	۱۲±۱/۵	۱۶±۱/۷	۱۱±۱/۷	ب.ا	۱۴±۱/۴
S.aureus 1	۲۴±۱/۵	۱۹±۱/۵	۱۵±۱/۷	۱۰±۱/۵	ب.ا	ب.ا	۱۴±۱/۷
S.aureus 2	۲۵±۱/۷	۱۸±۱/۵	۹±۱/۷	۱۱±۱/۵	ب.ا	ب.ا	۱۳±۱/۵
S.aureus 3	۲۲±۱/۵	۱۱±۱/۴	۱۱±۱/۷	۱۰±۱/۵	۱۰±۱/۵	ب.ا	۱۴±۱/۴
S.aureus 4	۲۹±۱/۷	۲۱±۱/۵	۱۸±۱/۴	۱۴±۱/۴	۱۰±۱/۵	ب.ا	۱۴±۱/۷
S.aureus 5	۲۳±۱/۷	۱۴±۱/۷	۱۰±۱/۷	۹±۱/۵	ب.ا	ب.ا	۱۲±۱/۴

ب.ا: بدون اثر

تولید ماده ضدمیکروبی توسط جدایه N2 در واحد زمان

میزان تولید ماده فعال برعلیه میکروب MRSA با نمونه‌گیری از سوسپانسیون ایزوله درحال رشد در محیط مایع فرمنتاسیون در واحد زمان مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل (۷) دیده می‌شود بیشترین مقدار تولید ماده‌ی ضدمیکروبی بر حسب هاله عدم‌رشد ۵۴ ساعت پس از شروع فرمنتاسون می‌باشد که هاله‌ی عدم‌رشدی نزدیک به ۲۰ میلی‌متر ایجاد کرده‌است. نتایج نشان می‌دهد فعالیت ضدمیکروبی عصاره خام جداشده در ۳۰ ساعت اول صفر بوده و سپس تا ۵۴ ساعت هم‌زمان با رشد باکتری میزان تولید متابولیت فعال روند افزایشی داشته و به اوج می‌رسد و پس از آن فعالیت ضدمیکروبی روندی کاهشی داشته و درنهایت در زمان ۱۱۰ ساعت به بعد به صفر می‌رسد.



شکل شماره ۷. ارتباط تولید ماده ضدمیکروب MRSA با رشد سویه‌ی N2 در واحد زمان

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه سعی شد برای اولین بار سویه های بومی منطقه کویری ایران برای تولید ترکیبات ضدمیکروبی علیه باکتری های مقاوم به دارو مطالعه و بررسی گردد. اهمیت انتخاب سویه مقاوم برای این پژوهش در حوزه سلامت و بهداشت بسیار بالا است. ایجاد و گسترش گونه‌های مقاوم میکروبی در سراسر جهان باعث می‌شود درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط سویه های مقاوم در دنیا با مشکل مواجه شود. جهت حل این مشکل در دنیا نیاز به ترکیبات فعال جدید است که یکی از ابزارها و منابع موجود برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدیدترکیبات طبیعی مثل باکتری های تولید کننده متابولیت های ثانویه بومی کشور است. با توجه به این که باکتری های اکسترموفیل موجود در کویر توانایی تولید متابولیت های فعال زیادی دارند و از طرفی شرایط خاص محیط انتخاب شده جداسازی سویه های بومی مناطق کویر شرقی ایران در این پروژه انتخاب شد.

در سال‌های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی ترکیبات فعال از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. در مطالعات قبلی، اغلب اثرات ضدمیکروبی بروی پاتوژن های غیر مقاوم صورت گرفته است (۱۹-۲۲). بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد تا کنون مطالعه روی باکتری های کفه نمکی برای جداسازی ترکیبات فعال علیه پاتوژن های مقاوم به دارو انجام نشده است(۲۳-۲۱). لذا با توجه به اهمیت باکتری های اکسترموفیل در زمینه تولید ترکیبات فعال، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و بررسی فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات فعال تولید شده توسط این سویه ها می‌باشد. در این تحقیق جداسازی ایزوله های فعال، استخراج متابولیت‌های سویه منتخب، غربالگری ثانویه با تست عصاره خام روی سویه مقاوم به آنتی بیوتیک، بررسی میزان تولید سویه منتخب و شناسایی مورفولوژیکی کلنی‌های مقاوم به دارو انجام شد.

در مطالعه عبدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ ، از بین ۱۱۰ نمونه خاک، تعداد ۳۱۰ ایزوله جدا شد که ۴۴ سویه فعالیت ضد میکروبی در غربالگری اولیه نشان دادند (۲۲). هم‌چنین در مطالعه مشابه دهناد و همکاران در سال ۱۳۸۸ در ایران از بین ۱۵۰ اکتینومیست جدا شده از محیط‌های خاکی، تعداد ۱۲ سویه دارای فعالیت ضدباکتریایی داشتند (۲۴). در مطالعه مشابه دیگر Sudha Kalyani و همکاران (۲۰۱۹)، تعداد ۹ نمونه خاک برای جستجوی اکتینومیست مورد مطالعه قرار گرفت که ۱۴۲ سویه جداسازی شد. از میان این سویه‌ها، تعداد ۶ سویه دارای فعالیت ضد میکروبی داشتند (۲۵). در تحقیق حاضر، از نمونه های کفه نمکی تعداد ۳۰ ایزوله جداسازی شد که همه ایزوله ها حداقل توانایی مهار یک پاتوژن را داشتند. با مقایسه نتایج این پژوهش و سایر مطالعات انجام شده، تعداد سویه‌های جدا شده با فعالیت ضدمیکروبی اولیه جالب توجه است. در مطالعه پژوهشی Al-Jouboriو همکاران در سال ۲۰۲۳ توانستند سویه استرپتومایسسی را از خاک امارات جداسازی کنند که دارای فعالیت ضد باکتریایی بود که این نتایج، مشابه یافته‌های پژوهش حاضر است (۴).

روش انتخابی ما برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله ها روش دیسک‌گذاری جهت تعیین سویه منتخب بود. در مطالعه Kumarو همکاران در سال ۲۰۱۴ در هند اثرات ضدباکتریایی سویه های جداشده از خاک را با روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند و نشان دادند بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶ میلی متر می باشد درحالی که در این پژوهش قطر هاله عدم رشد در برابر این باکتری ۲۹ میلی متر ثبت شد(۱۰). در یک مطالعه دیگر Sudha Kalyani و همکاران در سال ۲۰۱۹ فعالیت ضدمیکروبی سویه های استرپتومایسس اکسترموفیل را بررسی کردند و بیشترین قطر هاله عدم رشد را ۱۰ میلی متر ثبت کردند(۲۷) در حالی که میزان مهارکنندگی عصاره خام سویه ما علیه سویه های مختلف MRSA، در غلظت های مختلف بدست آمده بیشتر از این عدد بوده که در مقایسه با این دو پژوهش فعالیت ضدمیکروبی بهتری نشان داد.

در پژوهش انجام شده توسط ذاکر و همکاران در سال ۱۳۹۳ ، نشان دادند که باکتری های کویر لوت به عنوان منبع بیواکتیوهای فعال علیه باکتریهای بیماریزا می باشند(۲۶). در پژوهش حاضر فعالیت ضدمیکروبی عصاره خام سویه N2 ثابت شد و نتایج نشان داد غلظت های مختلف عصاره سویه ، مهارکنندگی رشد خوبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم دارند.

در مطالعات قبلی، اغلب سویه‌های تولید کننده از خاک‌های مناطق مختلف جدا شدند. در این تحقیق به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی میکروارگانیسم‌های بومی ایران، برای اولین بار از رسوبات کفه نمکی، باکتری ها جداسازی و مطالعه شدند. نتایج نشان داد که خاک کفه نمکی شهرستان بردسکن می‌تواند به عنوان منبع غنی از باکتری های فعال که توانایی تولید متابولیت‌های ضد باکتریایی جدید را دارند، مورد مطالعه دقیق‌تری در پژوهش های آینده قرار گیرد. بنابراین با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولیت‌های فعال باکتری های کفه نمکی ، بتوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، معرفی کرد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، و مقایسه آن با مطالعات مشابه در این زمینه می توان گفت که عصاره خام ایزوله منتخب می‌تواند به عنوان یک منبع از ترکیبات ضدمیکروبی جدید علیه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد مطالعه دقیق‌تری قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی می‌باشد که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه فرهنگیان و مدیر محترم امور پردیس های دانشگاه فرهنگیان خراسان رضوی به دلیل تأمین هزینه‌های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات تشکر به‌عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافعی در این پژوهش وجود نداشته است.

کد اخلاق

با توجه به استفاده نکردن از نمونهٔ انسانی–حیوانی، نیاز به تهیهٔ کد اخلاق نبود.

حمایت مالی

دانشگاه فرهنگیان حامی مالی این پژوهش بوده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی ایده: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری

روش کار: حامد نوروزی طاهری، حسن باقری یزدی

جمع آوری داده ها: حامد نوروزی طاهری

تجزیه و تحلیل داده ها: حسن باقری یزدی، حمید رضا وطن پور

نظارت: حسن باقری یزدی

مدیریت پروژه: حسن باقری یزدی

نگارش پیش نویس اصلی: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری، حمید رضا وطن پور

نگارش، بررسی و ویرایش: حسن باقری یزدی، حامد نوروزی طاهری.

References

1. Mozaffarian V. Compositae (Anthemideae & Ehinopeae) no. 59. Tehran: Research Institute of Forest and Rangelands. Flora of Iran. 2008; pp. 199-261.
2. Bagheri yazdi H, Norouzi taheri H. Antimicrobial Effects of Aqueous-Alcoholic Extract of Artemisia Turanica against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An in vitro Study. J Ilam Uni Med Sci. 2022; 30:1-7. doi: 10.52547/sjimu.30.2.1.
3. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran, Iran: Farhang Moaser; 1998.
4. Siti Junaidah A, Suhaini S, Mohd Sidek H, Basri D F, Zin N M. Anti-Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Activity and Optimal Culture Condition of Streptomyces sp. SUK 25. Jundishapur J Microbiol. 2015;8: e16784. doi: 10.5812/jjm.16784.
5. Tan RX, Tang HQ, Hu J, Shuai B. Lignans and sesquiterpene lactones from Artemisia sieversiana and Inula racemosa. Phytochemistry. 1998; 49:157-161. doi: 10.1016/s0031-9422(97)00889-3.
6. Bora KS, Sharma A. The genus Artemisia: a comprehensive review. Pharm Biol. 2011; 49:101-109. doi: 10.3109/13880209.2010.497815.
7. Ellis MD, Baxendale FP. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. J Econ Entomol. 1997; 90:1087-91. doi: 10.1093/jee/90.5.1087.
8. Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae Eucheumad enticulatum against Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes. Res J Biol Sci. 2009; 4:519-24.
9. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Emerg Infect Dis. 2001; 7:323-6. doi: 10.3201/eid0702.010236.
10. Saravana Kumar P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil Streptomyces sp. SCA 7. Kaohsiung J Med Sci. 2014; 30:435-46. doi: 10.1016/j.kjms.2014.05.006.
11. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:505-20. doi: 10.1128/CMR.10.3.505.
12. Mansouri S, Khaleghi M. Antibacterial resistance pattern and frequency of methicilin-resistant staphylococcus. aureus isolated from different sources in southeastern Iran. Iran J Med Sci. 1997; 22:93-96.
13. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian J Plant Sci. 2004; 3: 104-107. doi: 10.3923/ajps.2004.104.107.
14. Murphy Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 564-82. doi: 10.1128/CMR.12.4.564.
15. Norouzi H, Rabbani khorasgani M, Danesh A. Anti-MRSA activity of a bioactive compound produced by a marine Streptomyces and its optimization using statistical experimental design. Iran J Basic Med Sci. 2019; 22: 1073-84. doi: 10.22038/ijbms.2019.33880.8058.
16. Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil. Fitoterapia. 2002; 73:532-5. doi: 10.1016/s0367-326x (02)00175-2.
17. Andrews J. for the BSAC Working Party on Susceptibility Testing, BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 256-78. doi: 10.1093/jac/dkn194.
18. Nostro A, Ger MP, Angelo VD, Cannatelli MAC. Extractionmethods and biouautography for evallution plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 15:379-85. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00731. x.
19. Salar Bashi D, Attaran Dowom S, Fazly Bazzaz BS, Khanzadeh F, Soheili V, Mohammadpour A. Evaluation, prediction and optimization the ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology: antioxidant and biological properties of Stachys Parviflora L. Iran J Basic Med Sci. 2016;19: 529-41.
20. Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of Artemisia aucheri, Artemisia sieberi and Hyssopus officinalis L. on the food borne pathogenic bacteria. FSCT. 2015; 12:73-84.
21. Soheili V, Khedmatgozar Oghaz N, Sabeti Z, Fazly Bazzaz BS. The novel effect of cis-2-decenoic acid on biofilm producing Psudomonas aeruginosa. Microbiol Res. 2016; 6: 1. doi:10.4081/mr.2015.6158.
22. Abdi K, Dehnad R, Mosai J, Rahmani T. Screening of Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. Res J Microbiol. 2011; 6: 385-93.
23. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high concentration antimicrobial disks. Antimicrob Agents Chemother. 1973; 3: 418-24. doi: 10.1128/AAC.3.3.418.

24. Ashrafpour M, Rezaei H, Sefidgar A, Baradaran M, Sharifi H. Survey of the antibacterial properties of aqueous ethanolic and methanolic extraction of Artemisia annua around the city of Babol. J Ilam Uni Med Sci. 2015; 23:129-41.
25. Kalyani BS, Krishna PS, Sreenivasulu K. Screening and identification of novel isolate Streptomyces sp. NLKPB45 from Nellore costal region for its biomedical applications. Saudi J Biol Sci. 2019; 26:1655-60. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.027.
26. Zaker B, Hashemi Sh. Isolation of actinomycetes from Lut desert soil as a source of active bioactives against bacteria. NCMBJ. 2013; 4:1.
27. Al-Joubori B, Saadoun I, Hotchin N, Cunningham D. The isolation of novel terrestrial Streptomyces strains with antimicrobial and cytotoxic properties. Arab J Basic Appl Sci. 2023;30;285-98. doi: 10.1080/25765299.2023.2207957.