الصفات اللونية و التضاد الحيوي لبكتيريا *Streptomyces* معزولة من تربة منطقة السكت - مصراته

أ. هناء عمر إبراهيم صافار
h.safar@sci.misuratau.edu.ly
كلية العلوم – جامعة مصراته

الملخص:

العديد من الميكروبات لها القدرة على إنتاج المضادات الحيوية من أهمها الأكتينوميسيتات. هدفت الدراسة إلى عزل أهم أجناسها المنتجة للمضادات الحيوية (*Streptomyces*) من تربة منطقة السكت الواقعة بمدينة مصراته، ودراسة بعض صفاتها المورفولوجية المتمثلة في تحديد صفاتها اللونية وأيضا دراسة فاعليتها التضادية. جمعت 6 عينات من التربة، عزلت منها *Streptomyces* باستخدام وسط starch casein agar باتباع طريقة التخفيف. ثم درست الصفات اللونية بالاعتماد على معايير مقترح الستربتوميسس الدولي باستخدام وسط yeast extract-malt extract agar. بعد ذلك اختبرت الفاعلية التضادية للعزلات باستخدام طريقة التخطيط المتعامد ضد بكتيريا الاختبار الموجبة جرام: *Bacillus* sp. , *Staph. aureus Staph. epidermidis*، والسالبة جرام: *E. coli* , *Klebsiella* sp. , *Proteus* sp.. عزلت 41 عزلة من بكتيريا *Streptomyces* قسمت على اساس لون الميسيليوم الهوائية إلى خمسة مجاميع لونية: الأبيض، الرمادي، الأصفر، البرتقالي والأخضر، وكانت نسبة العزلات البيضاء الأعلى بنسبة 60.97%، كما قسمت على أساس لون الميسيليوم الخضرية إلى مميزة وغير مميزة، وكانت نسبة العزلات الغير مميزة الأعلى بنسبة 63.41%، أيضاً قسمت على أساس قدرتها على تكوين أصباغ ذائبة إلى مكونة وغير مكونة، وكانت نسبة العزلات الغير مكونة هو الأعلى بنسبة 87.80%. من ناحية أخرى، أظهرت نتائج دراسة الفاعلية التضادية أن 53.65% من إجمالي العزلات كانت غير نشطة،

و46.34% كانت ذات فعالية تضادية ضد واحد أو أكثر من بكتيريا الاختبار الموجبة والسالبة لصبغة جرام، وأن عزلتين من أصل 19 عزلة نشطة كانت ذات نشاط تثبيطي ضد جميع بكتيريا الاختبار الموجبة والسالبة.

المقدمة:

تمثل الكائنات الحية الدقيقة مصدرا مهما للنواتج الطبيعية المفيدة من الناحية الطبية بما في ذلك المضادات الحيوية (Parekh *et al*., 2000). المضادات الحيوية مواد كيميائية عضوية تفرزها بعض أنواع الميكروبات كنواتج ثانوية لعمليات الأيض الغذائي والتي تستطيع بتركيزات منخفضة قتل أو إيقاف نمو كائنات أخرى (مبارك وآخرون، 2005). العديد من البكتيريا، الأكتينوميسيتات والفطريات لها القدرة على إنتاج المضادات الحيوية، وتنتجها في الطبيعة استجابة للظروف التنافسية (حسن، 2008). تعتبر الأكتينوميسيتات من أهم الكائنات المنتجة للمضادات الحيوية، فحوالي 45% من المضادات الحيوية التي تنتجها الميكروبات مصدرها الأكتينوميسيتات (Vimal *et al*., 2009).

الأكتينوميسيتات هي بكتيريا ذات طبيعة خيطية هوائية موجبة لصبغة جرام (Ventura *et al*., 2007)، تنتشر على نطاق واسع في الطبيعة حيث نجدها في البيئات الشائعة مثل التربة والمياه (Osky *et al*., 2004) وأيضاً في البيئات القاسية (Remyo and Vijayakumar, 2008). تضم العديد من الأجناس المنتجة للمضادات الحيوية والتي من أهمها جنس *Streptomyces* (Wellington *et al*., 1992).

وصف جنس *Streptomyces* لأول مرة من قبل العالمين Waksman وHenric في 1943 وهو يتبع طائفة Actinobacteria ضمن رتبة Actinomycetales في عائلة Streptomycetaceae (Anderson and Wellington, 2001).

يتميز جنس *Streptomyces* بتكوين مستعمرات طباشيرية كثيرًا ما تأخذ ألوانًا مميزة تمثل لون الميسيليوم الهوائية والجراثيم الكونيدية الناضجة التي تظهر من أعلى الطبق، ولون الميسيليوم الخضرية من أسفل الطبق، وأيضاً ظهور تغير في لون الوسط كليا أو جزئياً نتيجة لإفرازه لمواد أيضية ثانوية تعرف بالأصباغ الذائبة (Shirling and Gottlieb, 1966). من خصائصه الأخرى إفرازه لمادة متطايرة تعرف بالجيوسمين (geosmin) وهي المسؤولة عن إعطاء التربة رائحتها المميزة (ألكسندر، 1982).

في هذا البحث سنركز على عزل بكتيريا *Streptomyces* من تربة منطقة السكت الواقعة بمدينة مصراته – ليبيا، وتحديد صفاتها اللونية ودراسة قدراتها على إنتاج مضادات حيوية من خلال اختبار فاعليتها التضادية ضد أنواع مختلفة من البكتيريا.

المواد وطرائق البحث:

جمع عينات التربة:

جمعت 6 عينات تربة من أراضي زراعية في منطقة السكت الواقعة بمدينة مصراته، كل عينة كانت عبارة عن خليط من 4–5 حفر أخذت بعمق يتراوح ما بين 5–10 سم، بعد إزالة حوالي 1–2 سم من سطح التربة، وضعت كل عينة في كيس من النايلون النظيف، ثم نقلت إلى معمل الأحياء الدقيقة بكلية العلوم – جامعة مصراته، بعد ذلك جففت العينات عند درجة حرارة الغرفة، وتمت غربلتها للتخلص من الحصى والشوائب، بعدها حفظت في أكياس نايلون نظيفة جديدة لحين استعمالها (Abdulla, 1998).

عزل بكتيريا *Streptomyces*:

وزن 1 جم من كل عينة تربة. وضعت في دوارق زجاجية سعتها 250 مل، تحتوي كل منها على 99 مل من الماء المقطر المعقم، وضعت الدوارق في حضانة اهتزازية دورانية بمعدل 190 لفة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة، بعد ذلك حضرت سلسلة من التخفيفات العشرية لكل معلق تربة. نقل 0.1 مل من كل تخفيف إلى سطح أطباق بتري تحتوي على وسط starch casein agar (SCA) ضبط pH لهذا الوسط عند 7.2 (Kuster and Williams, 1964). وزع المعلق على السطح باستخدام ساق زجاجي معقم علي شكل حرف L. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28°م لمدة 7– 14 يوم (Abdulla, 1998).

تنقية وحفظ عزلات *Streptomyces*:

باستخدام طريقة التخطيط نقلت كل مستعمرة من بكتيريا *Streptomyces* إلى أطباق بتري تحتوي على وسط SCA للحصول على عزلات نقية. حفظت العزلات النقية على وسط SCA المائل عند درجة حرارة 4°م لحين استعمالها.

صبغة جرام:

استخدمت تقنية صبغة جرام لتحديد الشكل المظهري والتفاعل الموجب للعزلات (Nanjwade *et al.*, 2010).

الصفات اللونية لعزلات Strptomyces:

درست الصفات اللونية لعزلات بكتيريا *Streptomyce* على وسط yeast extract-malt extract agar (YEMEA) ضبط pH عند 7.2. بالاعتماد على معايير مقترح الستربتوميسس الدولي (Shirling and Gottlieb, 1966)، زرعت كل عزلة نقية من عزلات *Streptomyces* على وسط YEMEA، حضنت من 7–14 يوم عند درجة حرارة 28^{o}م. تم تحديد الصفات اللونية لها من خلال فحص لون كل من الميسيليوم الهوائية والميسيليوم الخضرية، وأيضاً من ناحية قدرتها على إنتاج الأصباغ الذائبة الملونة التي تظهر حول المستعمرة.

الفاعلية التضادية لعزلات *Streptomyces*:

درست الفاعلية التضادية لعزلات *Streptomyces* باستخدام طريقة التخطيط المتعامد (Cross streak) (Velho-Pereira and Kamat, 2011) ضد 6 عزلات من بكتريا الاختبار، ثلاثة منها موجبة لصبغة جرام: *Bacillus* sp. , *Staphylococcus epidermidis* *Staph. aureus* وثلاثة منها سالبة جرام: *E. coli, Proteus* sp. , *Klebsiella* sp. زرعت عزلات *Streptomyces* بشكل خط مستقيم في منتصف سطح طبق بتري يحتوي على وسط nutrient agar مكررين لكل عزلة، ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28^{o}م لمدة 5 أيام لتنمو العزلات وتنتج المضادات الحيوية، بعد ذلك نقل باستخدام الماسحات القطنية المعقمة من المعلق البكتيري لكل عزلة من بكتيريا الاختبار وزرعت على شكل خطوط مفردة متعامدة على خط نمو عزلات *Streptomyces*، يبدأ الزرع من الطرف البعيد عن عزلات *Streptomyces* وينتهي عند خط نموها، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37^{o}م لمدة 24 ساعة. تم الكشف عن العزلات المنتجة للمضادات البكتيرية من خلال وجود منطقة تثبيط لنمو واحد أو أكثر من بكتيريا الاختبار في المناطق القريبة من خط نمو *Streptomyces*. قيس طول منطقه التثبيط التي مثلث المسافة بين خط نمو *Streptomyces* وبكتيريا الاختبار بالمليمتر (ملم) باستخدام المسطرة.

النتائج والمناقشة:

عزلت 41 عزلة نقية من جنس *Streptomyces* من 6 عينات التربة التي جمعت في هذه الدراسة، باستخدام وسط SCA. اختيرت العزلات على أساس الصفات المورفولوجية لمستعمراتها، حيث تميزت مستعمرات *Streptomyces* بمظهرها الطباشيري، وصلابتها وشدة التصاقها على سطح الوسط الغذائي بواسطة الميسيليوم الخضرية، وأيضاً تميزت بألوانها المختلفة التي تعزى للون الميسيليوم الهوائية والجراثيم الكونيدية الناضجة. الفحص المجهري بين أن جميع العزلات كانت موجبة لصبغة جرام وذات شكل خيطي متفرع مميز لبكتريا *Streptomyces*.

أظهرت نتائج دراسة الصفات اللونية للعزلات باستخدام وسط YEMEA تباين في ألون الميسيليوم الهوائية الناضجة والتي على أساسها قسمت العزلات إلى خمسة مجاميع لونية: الأبيض، الرمادي، الأصفر، الأخضر والبرتقالي (جدول 1).

جدول (1): يبين المجاميع اللونية لعزلات *Streptomyces* على أساس لون الميسيليوم الهوائية، الميسيليوم الخضرية وإنتاج الأصباغ الذائبة الملونة على وسط YEMEA

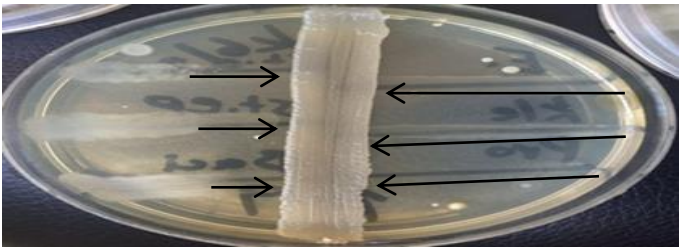
اللون	عدد العزلات	ميسليوم خضريـــة		أصباغ ذائبـــة	
		(+)	(−)	(+)*	(−)*
أبيض %	25 (60.97%)	7 (28%)	18 (72%)	4 (16%)	21 (84%)
رمادي%	11 (26.82%)	7 (28%)	4 (36.36%)	1 (9%)	10 (90.90%)
أصفر%	3 (7.31%)	1 (33.33%)	2 (66.66%)	0 (0%)	3 (100%)
أخضر%	1 (2.43%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
برتقالي%	1 (2.43%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
المجموع الكلي%	41 (100%)	15 (36.58%)	26 (63.41%)	5 (12.19%)	36 (87.80%)

(+): ذات ميسيليوم خضرية مميز، (−): ذات ميسيليوم خضرية غير مميز، (+)*: مكونة للأصباغ الذائبة الملونة، (−)*: غير مكونة للأصباغ الذائبة الملونة.

كان عدد العزلات البيضاء هو الأكثر بحوالي 25 عزلة (60.97%) من إجمالي العزلات، يليها العزلات الرمادية (26.82%) ثم الصفراء (7.31%)، ثم العزلات ذات اللونين البرتقالي

والأخضر بعدد عزلة واحدة لكل منهما بنسبة 2.43%. هذه النتائج اتفقت مع الدراسة التي أجراها كل من (Sadeghi *et al.*, 2014) و(Geylan *et al.*, 2008) من حيث أن عدد العزلات البيضاء كان الأعلى وتلاه اللون الرمادي في كلا الدراستين. من ناحية أخرى، اختلفت النتائج مع دراسة ناصر وناصر (2011) من حيث إن نسبة العزلات الصفراء كانت أكثر من العزلات الرمادية. قسمت العزلات أيضا بالاعتماد على لون الميسيليوم الخضرية والتي مثلت لون المستعمرة من الجانب الخلفي، إلى مميزة وغير مميزة (جدول 1). أظهرت النتائج أن 15 عزلة كانت ذات ميسيليوم خضرية مميز (36.58%)، أما العزلات غير المميزة فمثلت 26 عزلة (63.41%)، هذه النتائج تقاربت مع نتائج الدراسة التي أجراها (Abdullhameed, 2013). كما أظهرت النتائج أن بعض العزلات لها القدرة على انتاج أصباغ ذائبة (جدول 1)، والتي على أساسها قسمت إلى مجموعتين مكونة وغير مكونة حيث مثلت المكونة 5 عزلات من أصل 41 عزلة أي بنسبة 12.19%، أما العزلات غير المكونة فمثلت 87.80%. هذه النتائج اختلفت مع نتائج (Melluoli *et al.*, 2012) حيث مثلت العزلات منتجة للأصباغ الذائبة 63.23% وهذه النسبة أعلى من النتيجة المتحصل عليها في هذه الدراسة.

من ناحية أخري، تم تحديد الفاعلية التضادية (التثبيطية) لعزلات *Streptomyces* على وسط nutrient agar باستخدام طريقة التخطيط المتعامد (شكل1). أظهرت النتائج أن 22 عزلة (53.65%) من اجمالي العزلات كانت غير نشطة أي غير قادرة على إنتاج مضادات بكتيرية، وأن 19 عزلة (46.34%) كانت نشطة أي ذات فاعلية تضادية ضد واحدة أو أكثر من بكتيريا الاختبار (جدول 2). نتائج هذه الدراسة تقاربت مع النتائج التي تحصل عليها بشير وآخرون (2010)، حيث بلغت نسبة العزلات الغير نشطة 62%، والعزلات النشطة 37%. ومن ناحية أخرى اختلفت هذه النتائج عن دراسة (Ajijur Rahman *et al.*, 2011) التي أظهرت أن 53.3% من إجمالي عزلات *Streptomyces* المعزولة من تربة بنقلاديش كانت نشطة ضد واحد أو أكثر من بكتيريا الاختبار الموجبة والسالبة، و46.6% كانت غير نشطة. في دراسة أخرى(Ramazani *et al.*, 2013) حول تقدير الفاعلية التضادية لعزلات من *Streptomyces* المعزولة من تربة محافظة زنجان في إيران، أظهرت النتائج أن 67.3% من العزلات كانت ذات فاعلية تضادية ضد واحدة أو أكثر من بكتيريا الاختبار الموجبة والسالبة هذه النسبة كانت أعلى من النسبة المتحصل عليها في هذه الدراسة.



شكل(1): يوضح الفاعلية التضادية لعزلة من *Streptomyces* ضد بكتريا الاختبار

جدول (2): يبين الفاعلية التضادية لكل مجموعة من المجاميع اللونية لعزلات *Streptomyces*

اللون	أبيض %	رمادي %	أصفر %	أخضر %	برتقالي %	المجموع الكلي%
عدد العزلات %	25(60.97%)	11(26.82%)	3(7.31%)	1(2.43%)	1(2.43%)	41(100%)
عدد العزلات الغير النشطة %	13(52%)	6(54.54%)	1(33.33%)	1(100%)	1(100%)	22(53.65%)
عدد العزلات النشطة %	12(48%)	5(45.45%)	2(66.66%)	0(0%)	0(0%)	19(46.34%)
عدد العزلات النشطة ضد:						
% *Bacillus* sp.	7(58.33%)	3(60%)	2(100%)	0(0%)	0(0%)	12(63.15%)
Staph. aureus %	6(50%)	3(60%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)	10(52.63%)
Staph. epidermidis %	5(41.66%)	2(40%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)	8(42.10%)
Klebsiella sp. %	5(41.66%)	3(60%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)	9(47.36%)
% *E. coli*	4(33.33%)	1(20%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)	6(31.57%)
% *Proteus* sp.	2(16.66%)	1(20%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	3(15.78%)

أيضًا اتضح من خلال النتائج أن أعلى نسبة تثبيطيه للعزلات كانت ضد البكتيريا الموجبة. فمن أصل 19 عزلة نشطة حوالي 16 عزلة أي بنسبة 84.21% كانت ذات نشاط تثبيطي ضد واحدة أو أكثر من بكتيريا الاختبار الموجبة، وأن أعلى نسبة للفاعلية التضادية لعزلات *Streptomyces* كانت ضد بكتيريا *Bacillus* sp. بمعدل 12عزلة (63.15%)، تليها بكتيريا *Staph. aureus* بمعدل 10عزلات (52.63%) ثم بكتيريا *Staph. epidermidis* بمعدل 8

عزلات (42.10%) من إجمالي عزلات *Streptomyces* النشطة. من ناحية أخرى، اظهرت النتائج أن 11 عزلة من أصل 19 عزلة والتي مثلت 57.89% من إجمالي العزلات كانت ذات نشاط تثبيطي ضد واحدة أو أكثر من بكتيريا الاختبار السالبة، وأن أعلى نسبه تثبيطيه كانت ضد بكتريا *Klebsiella* sp. بمعدل 9 عزلات (47.36%)، يليها *E. coli* بمعدل 6 عزلات (31.57%)، ثم *Proteus* sp. بمعدل 3 عزلات (15.78%) من إجمالي العزلات النشطة.

إضافة إلى ذلك أظهرت النتائج (جدول 3) أن عزلتين رمز إليهما بـــ Strep2 و Strep28، كانتا ذات نشاط تثبيطي ضد جميع بكتيريا الاختبار الموجبة والسالبة، تميزت Strep2 بأنها كانت ذات ميسيليوم هوائية بيضاء اللون وميسيليوم خضرية غير مميز وغير مكونة للأصباغ الذائبة الملونة، أما Strep28 فتميزت باللون الرمادي وميسليوم خضرية مميز وأيضًا كانت غير مكونة للأصباغ الذائبة. من ناحية أخرى، أظهرت نتائج الفاعلية التضادية أن أعلى نشاط تثبيطي كان للعزلة Strep2 حيث بلغ متوسط منطقه التثبيط ما بين 5 ملم ضد بكتيريا *Klebsiella* sp. إلى 20 ملم ضد بكتيريا *Staph. aureus* ، أما العزلة Strep28 فأعطت نشاط تثبيطي أقل من العزله Strep2 ضد بكتيريا الاختبار حيث بلغ متوسط منطقة التثبيط ما بين 2 ملم ضد *E. coli* إلى 13 ملم ضد *Bacillus* sp. النتائج المتحصل عليها توضح أن الاكتينوميسيتات وخاصة جنس *Streptomyces* مصدر مهم للعديد من المضادات الحيوية، وأن تربة منطقة السكت الواقعة بمدينة مصراته تعتبر بيئة غنية بالعديد من عزلات *Streptpmyces* المنتجة للمضادات الحيوية والتي يمكن الاستفادة منها من الناحية الطبية.

جدول (3): يبين عزلات *Streptomyces* التي أظهرت الفاعلية التضادية ضد بكتريا الاختبار وصفاتها اللونية

رمز العزلات	لون الميسيليوم الهوائية	لون الميسيليوم الخضرية*	الأصباغ الذائبة**	الفاعلية التضادية – طول منطقة التثبيط (ملم)***					
				Stap.au.	*Stap.ep.*	*Baci.*	*Kleb.*	*prot.*	*E.coli*
Strep2	أبيض	–	–	20	15	12	5	10	15
Strep28	رمادي	+	–	6	4	13	10	6	2

*: (+) مميزة، (–) غير مميزة، **: (+) مكونة للأصباغ الذائبة (–) غير مكونة للأصباغ الذائبة

***: متوسط منطقة التثبيط بالمليمتر(ملم) لمكررين لكل عزلة.

التوصيات:

- استخدام المجهر الإلكتروني لتحديد الصفات المورفولوجيا المتمثلة في شكل السلاسل الكونيدية للعزلات، وأيضًا دراسة الصفات البيوكيميائية المتمثلة في استخدامها لمصادر الكربون وإنتاجها لصبغة الميلانين.
- دراسة قدرة عزلات *Streptomyces* على إنتاج المضادات الفطرية ضد أنواع من الفطريات الممرضة، أيضًا البحث عن عزلات جديدة من *Streptomyces* منتجة للمضادات الحيوية من مناطق أخرى من مدينة مصراته.

Abstract:

Many microorganisms have the ability to produce antibiotics, especially actinomycetes. This study was aimed to isolate the most important actinomycetes genera producing antibiotics, the genus *Streptomyces* from the soil of Sket area in Misurata city, then determination of their color characteristics and investigation of their antagonistic activity. Six soil samples were collected, *Streptomyces* were isolated using the starch casein agar media by the dilution method, color characteristics of these isolates were determined according to international *Streptomyces* project recommendation by using yeast extract-malt extract agar media, then antagonistic activity of the isolates was investigated using cross streak method against pathogenic test bacteria, gram positive: *Staph. aureus, Staph. epidermidis, Bacillus* sp. ,and gram negative: *E. coli, Klebsiella* sp., *Proteus* sp. 41 *Streptomyces* isolates were isolated and divided according to the color of aerial mycelium into five color series: white, gray, yellow, orange and green, white isolates had highest percentage of occurrence 60.97%, also isolates were divided according to the color of the substrate mycelium into distinctive and non-distinctive. Non-distinctive isolates had highest percentage 63.41%, the

isolates were also divided according to ability to produce soluble pigment into produced and not produced, not produced isolates had the highest percentage 87.80%. On the other hand, the results of antagonistic activity showed that 53.65% of the isolates were not active, while 46.34% of *Streptomyces* isolates were active against one or more of gram positive and negative test bacteria. Out of 19 active isolates only two isolates exhibited antagonistic activity against all of tested bacteria.

Key words: *Streptomyces*, isolation, color characteristics, antagonistic activity, cross streak method.

المصـــادر والمراجـع

أولاً: العربية.

1- مارتن ألكسندر، مقدمة في ميكروبيولوجيا التربة، الطبعة الثانية، دار جون ويلي وأولاده للنشر، نيويورك، 1982م، ص7-573.

2- محمد بشير، سهى سليمان إيليا، إسماعيل قاسم، التحري عن الفاعلية المضادة للجراثيم لبعض عزلات *Streptomyces* المعزولة من محافظة نينوي، مجلة مركز البحوث التقنيات الإحيائية، 2010م، ص24-32.

3- متني حامد حسن، عزل وتشخيص بكتريا منتجة للمضادات الحيوية من تربة مدينة الرمادي، مجلة الأنبار للعلوم الصرفة، العدد الثالث، المجلد الثاني، 2008م، ص1991-8941.

4- محمد الصادي مبارك، عبد الوهاب عبد الحفيظ، راوية فتحي جمال، عالم البكتريا، الطبعة الأولى، مكتبة أوزوريس للنشر والتوزيع، القاهرة – مصر، 2005م، ص1011-1017.

5- نزار أدور ناصر، هادي أمين ناصر، دراسة الخواص البيئية والمظهرية للبكتريا *Streptomyces* المعزولة من ترب المحافظات الشمالية في العراق، مجلة ديالى العلمية، العدد الرابع، المجلد السابع، 2011م، ص83-99.

ثانياً: الأجنبية.

1- Abdulla K. (1998). Distribution of *Streptomyces* color series in some non-cultivated Iraqi soils and their antimicrobial activity against gram negative bacteria. Thesis for master degree. Yarmok University, Jordan.

2- Abdullhameed, Z. (2013). The isolation and study of morphological characterization of *Streptomyces* isolation from the soil as source of active antibiotic. College of Education Researchers Journal, PP: 3-12.

3- Ajijur Rahman, M. D., Zahidul Islam, M., Anwar, U. I. and Islam, M. D. (2011). Antibacterial activity of actinomycetes isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. Biotechnology Research International, PP: 857925.

4- Anderson, A. S. and Wellington, E. M. H. (2001). The taxonomy of Streptomyces and related genre. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiolog, 51:797-814.

5- Geylan, O., Okmen, G. and Ugur, A. (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic resistant's bacteria. EurAsian Journal of Biosciences, 2: 73-82.

6- Kuster, E. and Williams, S. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature, 202: 928-929.
7- Mellouli, L., Bejar, S. and Ben Fguira L. (2012) Isolation and screening of *Streptomyces* from soil of Tunisia Oases ecosystem for non-polygenic antifungal metabolites. African Journal of Biotechnology, 11(29):7512-7519.
8- Nanjwade, B. K., chandrashekhara, S., Ali, M. S., Prakash, S. G. and Fakirappa, V. M. (2010). Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 9(3): 231-239.
9- Oskey, M., Tamer, A. U. and Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology, 3(9): 411-446.
10- Parekh, S., Vinci, V. A. and Strobel, R. J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation process. Applied Microbiology Biotechnology, 45:287-301.
11- Ramazani, A., Moradi, S., Sorouri, R., Javani, S. and Garshasbi, M. (2013). Screening for antibacterial activity of *Streptomyces* species isolated from Zanjan Provice, Iran. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 3(2): 342-349.
12- Remyo, M. and Vijayakumar, R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. Facta Universities Series: Medicine and Biology, 15(1):13-19.
13- Sadeghi, A., Soltani, B., Jouzani, G., Karimi, E., Nekouei, M. and Sadeghizadeh, M. (2014). Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. Strain C-2012 and the effect of salt and ectione on *lon* expression level. Microbiological Research, 169(2-3):232-238.
14- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 22(4):265-394.
15- Velho-Pereira, S. and Kamat, N. M. (2011). Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 73(2):223-228.
16- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. and et al. (2007). Genomic of actinobacteria: tracing the evolutionary history of ancient phylum. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71:495-548
17- Vimal, V., Rajan, B. M. and Kannabiran, K. (2009). Antimicrobial activity of marine actinomycetes, Nocardiopsis sp. VITSVK5 (FJ973467). Asian Journal Medical Sciences, 1(2):57-63.
18- Wellington, E. M. H., Cresswell, N. and Herron, P. R. 1992. Gene transfer between Streptomyces in soil. Gene, 115:193-198.