

جداسازی استرپتومیست‌های بازدارنده رشد انتروکوک مقاوم به ونکومايسين از خاک‌های زراعی شهر قم

فاطمه الزاملی^۱، احمد علی پوربابایی^{۲*}، سید سهیل آقایی^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۰۹)

چکیده

عفونت‌های ناشی از انتروکوک‌های مقاوم به ونکومايسين (VRE) در تمامی دنیا در حال افزایش است. مقاومت این باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی در ارتباط با ژن‌های *van A*, *B*, *C*, *D*, *E* است که باعث کاهش تأثیر این آنتی بیوتیک‌ها در دیواره ی این باکتری‌ها می‌شود. اکثر نمونه‌های VRE متعلق به انتروکوکوس فیسیوم هستند که به طور ذاتی به توبرامایسین مقاوم اند بنابراین از جنتامایسین بعنوان آمینوگلیکوزید انتخابی برای درمان ترکیبی با عوامل باکتریسیدال استفاده می‌شود. اخیراً گزارش شده که بسیاری از VREها مقاومت بسیار بالایی به همه ی آمینوگلیکوزیدها حتی جنتامایسین نشان میدهد. با توجه به گسترش سویه‌های مقاوم انتروکوک، لذا این تحقیق برای یافتن مواد ضد میکروبی جدید برای مقابله با انتروکوک مقاوم به ونکومايسين انجام شده است. بعد از نمونه برداری از خاک‌های زراعی قم و روستاهای اطراف، جداسازی و شناسایی سویه‌های استرپتومايسيس بر روی محیط ISP4 انجام شد. پس از جداسازی و خالص سازی، جدایه‌ها را بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومايسين در محیط کشت MHA، BHI، Hicky tanser 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 انتروکوک 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 *Streptomyces tendae* ATCC 19812 می‌باشد. آنالیز GC-Mass پس از استخراج ماده موثره بوسیله حلال اتیل استات از محیط کشت نشان داد که ماده موثر احتمالاً " یک ترکیب کوئینولینی باشد.

کلیدواژگان

انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، جداسازی استرپتومايسيس.



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 کاربرد نابلجای این ترکیبات ضد میکروبی است که منجر به افزایش میزان عفونت‌ها و حتی مرگ‌ومیر در بیماران 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).

میکروارگانسیم‌هایی 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 میکروارگانسیم‌ها که تولیدکننده قسمت اعظم آنتی‌بیوتیک‌ها در طبیعت هستند اکتینومیسیت‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها ساپروفیت‌های رشته‌ای گرم‌مثبتی هستند که به طور وسیعی در خاک، آب و گیاهان پراکنده می‌باشند و به عنوان یکی از بزرگ‌ترین جمعیت‌های باکتری‌های خاکری شناخته می‌شوند. اکتینومیسیت‌ها تولیدکننده تعداد زیادی از ترکیبات اساسی و حیاتی برای سلامتی انسان از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، تنظیم‌کننده‌های 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 انتروکوک‌ها در مواردی شامل عفونت‌های مجاری ادراری، جراحات‌های 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 et al, 2000).

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 انتروکوک‌ها 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 β -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 اکتینومیسیت‌ها بود، که بتواند مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE باشد، موفق به جداسازی و شناسایی جدایه ی استرپتومیسس KH-614، شد که



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 رقت‌های سریالی تهیه شد (M. Kavya et al., 2012).

انجام کشت اولیه با روش Spread plate method

۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط ISP4 و GYE انتقال داده شد وبا میله ی شیشه ای سر کج استریل بر روی کل سطح آگار پخش شد سپس محیط‌های کشت به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، انکوبه شد، تا بررسی‌های بعدی روی آن‌ها صورت گیرد (M. Kavya et al., 2012).

شناسایی کلنی‌های اکتینومیست

با مشاهده ی پلیت‌ها، کلنی‌هایی که دارای ظاهر پودری یا گچی و به رنگ‌های سفید، خاکستری، قرمز، زرد، آبی و بنفش بودند، انتخاب گردیدند. سپس رنگ آمیزی گرم از این کلنی‌ها انجام شد. میکرو اورگانسیم‌هایی که زیر میکروسکوپ دارای ویژگی‌های اکتینومیست‌ها (گرم مثبت و آرایش رشته ای) بوده را، علامت گذاری کرده وبعد این کلنی‌ها به محیط کشت ISP2 انتقال داده شده است (M. Kavya et al., 2012).

تهیه ی کشت خالص از کلنی‌های اکتینومیست

کلنی‌هایی 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، با پیچیدن پارافیلیم به دور پلیت‌ها در یخچال نگه داری شدند تا برای بررسی‌های بعدی آماده باشند (M. Kavya et al., 2012).

مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE بود. او این کار را در سال ۲۰۰۲ در کشور کره انجام داد. برای جداسازی این باکتری از S medium و Av medium استفاده نمود. در پی آنالیزهایی 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 روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های خاک

جمع آوری نمونه‌های خاک از زمین‌های زراعی استان قم با استفاده از بیلچه ی باغبانی انجام شد. به این صورت که ابتدا لایه ی سطحی خاک را کنار زده شد و از عمق ۱۵-۵ سانتی متری عمل نمونه گیری صورت گرفت. نمونه ی خاک بلافاصله درونپوشش گیاهی منطقه و شماره ی نمونه بر روی پلاستیک مربوطه ثبت گردید. و نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال داده شد و در یخچال نگه داری شد تا مراحل بعدی روی آنها صورت گیرد (M. Kavya et al., 2012).

استفاده از تیمار caco3

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

مقدار ۱۰ g 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 ۲۰۰ rpm شیک گردید. از هر نمونه ی خاک ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون خاک به



انتروکوک مقاوم به ونکومايسين VRE

جدایه‌ی استاندارد انتروکوک مقاوم به ونکومايسين ATCC 51299 از آزمایشگاه رفرانس تهیه گردید.

ارزیابی جدایه‌ها از نظر تولید ماده‌ی ضد میکروبی

جدایه‌ی اکتینومیست جدا سازی شده به صورت دایره‌ای روی محیط کشت Hickey-trenser agar medium کشت داده شد سپس پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. سپس لوله‌های حاوی محیط BHI برآش، انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، روی پلیت‌های قبلی اضافه شد. (کدورت ایجاد شده در لوله‌های محیط مایع برابر با لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند تهیه شده بود) بعد از ۲۴-۴۸ ساعت نتایج ثبت گردید (Alireza, Dehnad et al., 2010).

انجام تست‌های بیوشیمیایی روی جدایه منتخب

تست‌هایی 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 و گرماگذاری به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، سوسپانسیون اسپوری از میکرواورگانیسم تهیه شد. برای این کار مقدار ۱۰ میلی‌لیتراب مقطر استریل را تهیه نموده و پس از اضافه نمودن اب مقطر استریل به لوله‌ی حاوی محیط کشت اسلنت، سطح کلنی‌ها با فیلدوپلاتین کمی خراش داده شد سپس به مدت

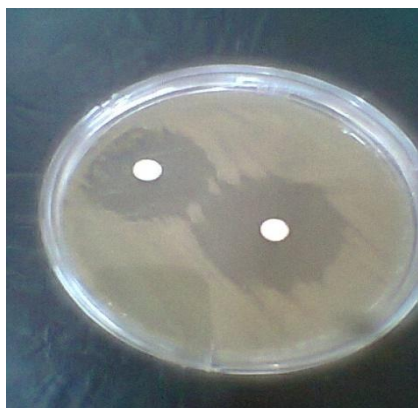
چند دقیقه شیک شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری استرپتومیسز به محیط کشت مایع اضافه شد (محیط کشت مایع که همان محیط تخمیر می‌باشد در ارلن‌هایی به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بود تهیه شده بود). سپس ارلن حاوی محیط کشت مایع در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰، ۱۷۰ و ۲۰۰ در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. هرروز به فاصله‌ی 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 چاهک‌هایی که از قبل روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شده با جدایه‌ی انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، ایجاد شده بود، تزریق شد. و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد سپس از نظر هاله‌ی عدم رشد بررسی شد (Mohamed E. osman et al., 2011).

ابتدا محیط کشت MHA در پلیت تهیه شد، بعد ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیونی برابر با لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند، از جدایه‌ی انتروکوک مقاوم به ونکومايسين که از قبل تهیه شده بود، روی پلیت‌ها پخش شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر از مایعی که حاوی ماده‌ی آنتی میکروبیال بود (در مرحله‌ی قبل تهیه شده بود)، روی دیسک‌ها تزریق شد. و بعد از گرماگذاری در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت، نتایج بررسی شد (M. Kavya et al., 2012).

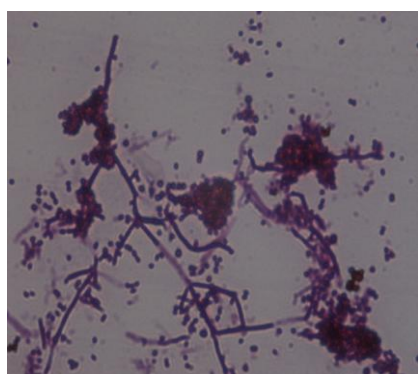
شناسایی ماده موثره بازدارنده رشد انتروکوک

ابتدا سوسپانسیون اسپوری از جدایه‌ی استرپتومیسز تهیه شد، سپس آنرا به محیط مایع مناسب تلقیح کرده و ۷ روز در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه و دور ۲۰۰ قرار داده شد، سپس مقداری از محیط مایع را در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و مایع رویی از فیلتر ۰/۲





ب



ج

شکل ۱- 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 می‌باشد. در اینجا انتروکوک مقاوم به ونکومایسین روی کل محیط پخش شده است و دیسک نشان داده شده حاوی ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع ۷ روزه جدایه E. P2 می‌باشد. در شکل ج رنگ آمیزی گرم جدایه E. P2 در زیر میکروسکوپ نوری نشان داده شده است.

میکرون عبور داده شد. سپس مقدار مساوی از مایع رویی واتیل استات را در قیف دکانتور مخلوط کرده و فاز آلی جدا گردید. با استفاده از تیوسولفات سدیم عمل آبگیری انجام شد و مایع حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. و مایع Column: TRB-5MS آمده جهت انجام (Length: 30 m, Internal diameter: 250 micrometer, Film thickness: 0. 25 micrometer, carrier gas: helium, Flow: 1 GC-MS (mL/min, GC: HP 6890, MSD: 5973 analysis به آزمایشگاه دانشگاه شریف ارسال گردید (Mostafa Y. El -Naggar et al, 2006).

نتایج

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

جدول ۱- قطر هاله توقف رشد ایجاد شده علیه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین توسط جدایه E. P2

| اندازه ی هاله ی ایجاد شده در غریال گری اولیه بر حسب mm | جدایه ی اکتینومیسیت |
|---|------------------------|
| ۲۶ | E. P2 |

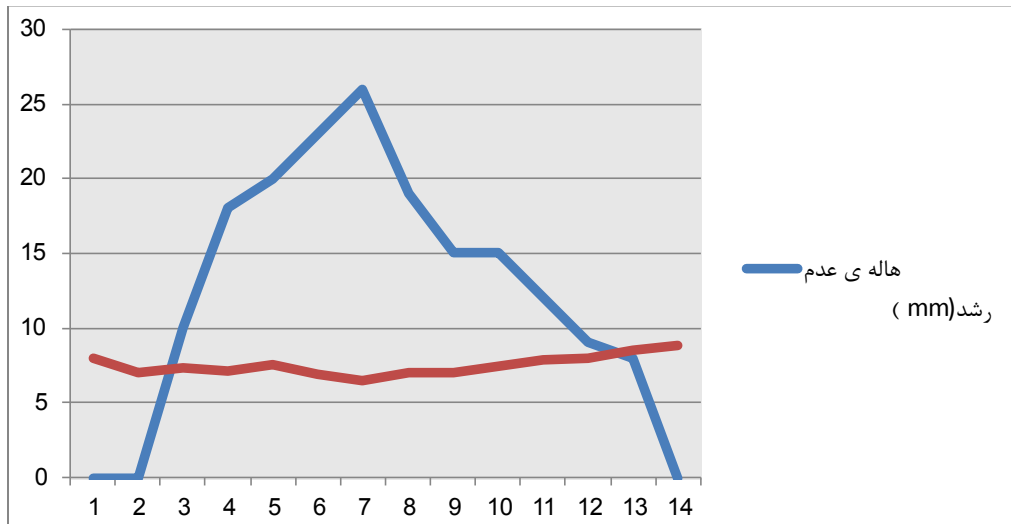
جدول ۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی

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



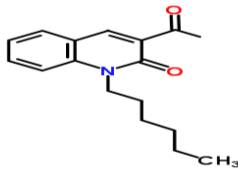
الف





شکل ۲- هاله ی عدم رشد ایجاد شده بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومايسين و pH مربوطه طی ۱۴ روز در محیط کشت مایع جدایه E. P2

P2 می‌باشد. استخراج این ماده از محیط کشت مایع توسط حلال آلی اتیل استات صورت گرفت.



شکل ۳- ساختار شیمیایی ماده ضد میکروبی حاصل از محیط کشت مایع جدایه E. P2

با بررسی نمودارهای حاصل از آنالیز GC-MS حاوی ماده موثره‌هاز محیط کشت مایع جدایه E. P2 بر علیه انتروکوک مقاوم به ونکومايسين، ماده ضد میکروبی حاصله اینگونه نام گذاری شد: 3-Quinoline 2-dihydro-2-oxo, 1-hexyl-1, Carboxylic acid
شکل ۴ مربوط به نتیجه آنالیز GC-MS محیط کشت مایع جدایه E. P2 می‌باشد. در این نمودار پیک مربوط به مواد موجود نشان داده شده است. بالاترین پیک مربوط به ماده ضد میکروبی حاصل از جدایه E.



شکل ۴- نمودار حاصل از آنالیز GC_MS محیط کشت مایع جدایه E. P2



بحث و نتیجه‌گیری

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 می‌باشد. یونگ ری که به دنبال جداسازی جدایه ای از اکتینومیست‌ها بود، که بتواند مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE باشد، موفق به جداسازی و شناسایی جدایه ی استرپتومیسز KH-614، شد که مولد ماده ی ضد میکروبی بر علیه VRE بود. او این کار را در سال ۲۰۰۲ در کشور کره انجام داد. برای جداسازی این باکتری از *S medium* و *Av medium* استفاده نمود. در پی آنالیزهایی 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).

مصطفی ال نگار در سال ۲۰۰۷ موفق به جداسازی جدایه ی استرپتومیسز HAL64، از خاک‌های مصر شد. ابتدا با توجه به مرفولوژی و ساختار دیواره ی سلولی این استرپتومیسز، آنرا به عنوان جنس استرپتومیسز شناسایی کرد. سپس با انجام آنالیز سکانس srRNA ۱۶ مشخص شد که این

باکتری همان استرپتومیسز می‌باشد. این جدایه مولد ماده ی ضد میکروبی قوی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بیماری زا بود. در صورتی که اثر این ماده ی ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های بیماری زای گرم منفی کمتر بود. آنتی بیوتیک تولید شده توسط این جدایه با سلیکاژل جدا شد سپس با Sephadex LH-20 Column خالص سازی شد و در نهایت خلوص آنتی بیوتیک تولید شده با روش HPLC ثابت گردید. ساختار شیمیایی آنتی بیوتیک خالص سازی شده با استفاده از آنالیزهای اسپکتروسکوپی، شناسایی شد. مشخص شد که این آنتی بیوتیک Kosinostatin می‌باشد. این آنتی بیوتیک یک کوینوسیکلین می‌باشد. این آنتی بیوتیک هم چنین توسط میکرومونوسپورا TP-A0468 نیز تولید می‌شود (Mustafa El-naggar, 2007).

تشکر و قدر دانی

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



منابع و مأخذ

1. 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.
2. 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.
3. Riyanti, Jaka Widada, and ocky karma Radjasa, 2009. Isolation and Screening of Antimicrobial producing – Actinomycetes symbionts in Nudibranch. Indonesian journal of Biotechnology, vol. 14, No. 1, pp: 1132 – 1138.
4. Mohitosh Biswas, Md. Ajjur Rahman, MST. Hejera Khatun and Md. Anwar – ul Islam, 2011. Isolation and cherecterization of streptomycetes sp. ANBS – 15 and Antimicrobial Activities of its secondary Metabolies. Bangladesh Pharmaceutical journal, Vol. 14, No. 1. p: 15 – 20.
5. 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.
6. Cosmina zeana, Christine J. Kubin, Phyllis Della – Letta, 2001. Vancomycin – Resistant Enterococcus faecium Meningitis successfully Managed with Linezolid: case Report and Review of the Literature, CIB: 477 – 82.
7. Barbara E. Murray, M. D., 2000. Vancomycin - Resistant Enterococcal infections. The new England journal of medicine, pp: 710 – 715.
8. 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.
9. M. Kavya Deepthi, M. Solomon sudhakar and M. Nagalakshmi Devamma, 2012, Isolation and Screening of streptomycetes sp. From coringa Mangrove soils for Enzyme production and Antimicrobial activity. IJP CBS, 2 (1): 110 – 116.
10. 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.
11. Houssan M. Atta, 2009. An Antifungal Agent Produced by streptomycetes olivaceiscleroticus, Az – SH 514. World Applied science journal 6 (11): 1495 – 1505.
12. Mohammad E. Osman Fath Allah H. Ahmad and Walla S. M. Abd El All, 2011. Antibiotic production from Local streptomycetes Isolates from Egyptian soil at wedey El – Natron. Australian journal of Basic and Applied scieaces, 5: 1906 – 1910.
13. Mostafa Y. El – Naggar, Samy A. El – Assar and sahar M. Abdul – Gawad, 2006. Meroparamycin production by newly Isolated streptomycetes sp. Strain MARO 1: Taxonemy, Fermentation, Purification and structural Elucidation. The journal of Microbiology, p: 432 – 438.
14. 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.
15. Ki – Hyeong Rhee, 2002. Isolation and characterization of streptomycetes sp. KH – 614 Producing anti VRE (Vancomycin – Resistant entrococci) antibiotics. J. Gen. Appl. Microbial., 48: 321 – 327.

