Journal of Education and Science
Vol. 28, No.3, 2019, pp.155-165
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Production of antibiotic of Microlides group from a local isolate of the bacterium *Streptomyces rimosus*

Mohammed B. Ismael **Safaa I. Al-Obaiede*** **Khalid D. Ahmed**
Department of biology / Education College for Pure Sciences
University of Mosul
Mohammed.ismael@gmail.com *drsafaaaloaede@yahoo.com khalid.ahmed@gmail.com

DOI: 10.33899/edusj.2019.162959

Received **Accepted**
16 / 02 / 2014 **08 / 05 / 2014**

Key word: Streptomyces, rimosus, antibiotics, Macrolides

Abstract

Three local isolates of the genus *Streptomyces* were obtained from ten soil samples collected from different places of Niniva governorate. The isolates showed bioactivity against test Gram positive and negative bacteria and two Genera of fungi. *Streptomyces* isolates were identified according to microscopic and morphological tests. The *Streptomyces* isolates were subjected to ultra violet ray for different time periods. The treated isolates showed little increase in inhibition zone and treated period of (5) minutes showed the best inhibition of the test bacteria. The *Streptomyces* isolates treated with N – methyl – N – nitro – N – nitroso guaniction at the concentration of (50) $\mu g/ml$ showed clear increase of antibiotic production. The isolate *Streptomyces* III showed clear inhibition against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* and the diameter inhibition zone was (20,29,20)mm respectively.

انتاج مضاد حيوي من مجموعة الماكروليدات من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces rimosus*

محمد بشير اسماعيل قاسم صفاء اسماعيل العبيدي* خالد دحام احمد

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة

جامعة الموصل

khalid.ahmed@gmail.com *drsafaaaloaede@yahoo.com Mohammed.ismael@gmail.com

DOI: 10.33899/edusj.2019.162959

الاستلام	القبول
2014 / 02 / 16	2014 / 05 / 08

الكلمات المفتاحية: Streptomyces, rimosus, antibiotics, Macrolides

الخلاصة

تم الحصول على 3 عزلات محلية من جنس *Streptomyces* من 10 عينات تربة جمعت من مناطق مختلفة من محافظة نينوى، بيّنت العزلات نشاطاً حيوياً ضد انواع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گرام وجنسين من الفطريات. شُخصت عزلات *Streptomyces* على اساس الاختبارات المايكروسكوبية والشكلية. عُرضت العزلات للأشعة فوق البنفسجية (UV) لفترات مختلفة من الوقت وبيّنت العزلات المعاملة زيادة طفيفة في منطقة التثبيط، وبيّنت فترة التثبيط (5) دقائق أعلى تثبيط للبكتريا المختبرة. ان عزلات *Streptomyces* التي عوملت بـ N – methyl – N – nitro – N – nitrosoguanidine mutagen (NTG) بتركيز (50) مايكروغرام/مل بيّنت زيادة واضحة بإنتاج المضادات الحيوية. بيّنت العزلة III *Streptomyces* تثبيط واضح ضد *Escherichia coli*،*Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* وكان قطر منطقة التثبيط (20،29،20) على التوالي.

المقدمة

تغير الـ *Streptomyces* من الكائنات البدائية النواة وحيدة الخلية موجبة لصبغة گرام واسعة الانتشار في الطبيعة وتعود إلى عائلة Streptomycetaceae ضمن رتبة Actinomycetaceae [1،2،3] وتظهر الـ *Streptomyces* في الاوساط الزرعية الصلبة بشكل مستعمرات صلبة شديدة الالتصاق بسطح الوسط الزرعي [4]، أما في الاوساط السائلة وخاصة عند تحضينها في الحاضنات الهزازة تظهر المستعمرات بأشكال كروية صغيرة وهذا النوع من النمو يكون مرغوباً به في الصناعات التخميرية لسهولة فصلها من الوسط الزرعي الحاوي على المنتوج، وممكن ان تظهر بعض الأنواع عكورة في الوسط الزرعي السائل وقد يكون نتيجة للتحلل الذاتي أو لوجود العاثيات[5] Actinophage.

ان الرائحة المميزة التي تنبعث من التربة تكون بسبب وجود الـ *Streptomyces* التي تنتج المواد العطرية مثل Acelyaldehyde او Isobutanol [6] أو لاحتوائها على مادة Geosmin التي يفرزها الغزل [7].

يعد جنس *Streptomyces* من الكائنات الدقيقة المهمة صناعياً كونه مصدراً جيداً لإنتاج العديد من المركبات الأيضية الثانوية مثل المضادات الحيوية النيوكلوسيدية المهمة جداً باعتبارها مضادات ضد العديد من الأمراض السرطانية [8،9]. استخدم عدد كبير من الباحثين *Streptomyces rimosus* كمصدر جيد لإنتاج العديد من المضادات الحيوية مثل المضاد Oxytetracycline وهو مضاد فعال تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة گرام .[10] اضافة إلى قابلية هذه العزلة على إنتاج العديد من المضادات النيوكلوسيدية المضادة للأمراض السرطانية مثل سرطان الدم (Leukemia) واهم هذه المضادات المضاد [11] Sangivamycin.

هدف البحث الحالي ينصب في عزل وتشخيص النوع *Streptomyces rimosus* المنتجة للمواد المثبطة لنمو بعض البكتريا والفطريات الممرضة ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المعزولة من تربة حقول زراعية في محافظة نينوى ومحاولة تشخيص المنتوج تشخيصاً جزئياً.

مواد وطرق البحث

جمع العينات

جمعت 5 عينة ترب من مواقع مختلفة من حقول زراعية في محافظة نينوى، ومن عمق (5 – 15) سم بعد ازالة (3) سم من سطح التربة، جففت العينات بعد معاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم ($CaCO_3$) بنسبة (1:10) وتجفيفها (40 – 45)^o سيليزية لمدة (4) ايام. وضعت بعدها في اكياس بولي اثيلين معقمة واغلقت بإحكام ثم وضعت في الثلاجة لحين الاستخدام. اخذ (1) غم من التربة ووضع في 10 مل من انابيب حاوية ماء مقطر ومزج بشكل جيد وحضر منها سلسلة من التخافيف العشرية إلى حد التخفيف السادس، واخذ (1) مل من التخفيف الاخير ووضع في طبق بتري معقم وصب عليه الوسط الزرعي نشا – كازائين (Starch – Casien medium) المعقم والمبرد إلى (45^o) سيليزية وبواقع ثلاث مكررات لكل عينة، ثم اختيرت الاطباق التي ظهر فيها (35 – 10) مستعمرة واختيرت عدد من المستعمرات المفردة واعيد زراعتها في الوسط نفسه للحصول على مزارع نقية [1، 12، 13]

الاوساط الزرعية

- وسط نشا – كازائين **(Starch – Casien medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (10) نشا، (0.3) كازائين، (KNO_3 (2، NaCl (2)، $CaCO_3$ (0.02) ، (2) KH_2PO_4، $MgSO_4.7H_2O$ (0.05)، $FeSO_4.7H_2O$ (0.01)، 18)) اكار في لتر ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند (7.2) وعقم بالمعقام [14] (Autoclave). استخدم هذا الوسط في العزل.

- وسط اكار مستخلص الخميرة والكليسيرول **(Glycerol yeast extract agar medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (5) كليسيرول، (2) مستخلص الخميرة، (K_2HPO_4 (0.1،25)) بيبتون، (15) اكار في لتر ماء مقطر عقم الوسط بجهاز المعقام عند درجة حرارة (121) سيليزية وتحت ضغط (15) باوند/انج مربع لمدة (15) دقيقة واضيف للوسط المضاد الحيوي (Nystatin) بتركيز (50) مايكروغرام/مل بعد ان برد إلى درجة حرارة (40^o) سيليزية [15]. استخدمت نفس ظروف التعقيم المذكورة لتعقيم جميع الاوساط المستخدمة في هذا البحث. استخدم هذا الوسط في العزل.

- وسط اكار الاسباراجين والكليسيرول **(Glycerol asparagine agar medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (1) اسباراجين، (10) كليسيرول، (K_2HPO_4 (1،20)) غم اكار، (1) مل من محلول الاملاح الضئيلة ($CuSO_4.5H_2O$ (0.64)) (Trace salts solution)، (0.11)

$FeSO_4.7H_2O$، $MnCl_2.4H_2O$ (0.79) ، $(0.15)ZnSO_4.7H_2O$ في لتر ماء مقطر ضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.4) وعقم بالمعقام [16]. استخدم هذا الوسط في العزل. استخدم هذا الوسط في العزل.

- وسط الاكار المغذي **(Nutrient agar medium)**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxiod) بإذابة (23) غم من الاكار المغذي في (1) لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.2) وعقم بالمعقام. استخدم هذا الوسط للفعالية الضدية.

- وسط اكار الكلوكوز ومستخلص الخميرة والتربتون **(Trypton – yeast extract glucose agar medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (10) كلوكوز، (3) مستخلص الخميرة، (5) تربتون، (K_2HPO_4 (1، (1) KH_2PO_4، 20)) اكار في لتر ماء مقطر وعقم بالمعقام .[17] استخدم هذا الوسط في التشخيص.

- وسط اكار الاملاح المعدنية والنشا **(Starch mineral salts medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (10) نشا، $(NH_4)_2SO_4$ (2، (2) $CaCO_3$، (1) K_2HPO_4، (1) NaCl، (20) اكار في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.0) وعقم بالمعقام .[17] استخدم هذا الوسط في العزل.

- وسط اكار زابك – دوكس **(Czapic – Dox agar medium)**

حضر بإذابة (غم/لتر): (30) سكروز، $NaNO_3$ (3، $MgSO_4.7H_2O$ (0.5) K_2HPO_4 (1) ، KCl (0.5)، $FeSO_4$ (0.01)، 15)) اكار في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.3) وعقم بالمعقام .[18] استخدم هذا الوسط في العزل. استخدم هذا الوسط في العزل.

- وسط انتاج المضادات الحيوية **(Antibiotics production medium)**

حضر وسط انتاج المضادات الحيوية المحور بإذابة (غم/لتر) NaCl (0.8): NH_4Cl، (1) ، (0.1) K_2HPO_4، $MgSO_4.7H_2O$ (0.1)، $CaCl_2$ (0.04)، 10)) كلوكوز، (3.0) مستخلص الخميرة في لتر ماء مقطر وضُبط الاس الهيدروجيني عند (7.3) وعقم بالمعقام [11].

العزل

تشخيص عزلة *Streptomyces*

شخصت العزلات التي شك انها تابعة لجنس *Streptomyces* اعتماداً على لون وشكل المستعمرات على وسط اكار الاملاح المعدنية والنشا وشكل الغزل الهوائي والارضي وترتيب سلاسل السبورات باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (Slid culture technique) [2، 16] .

بكتريا الاختبار

استخدمت البكتريا *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aurous* ، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus vulgaris*، *Enterobacter aerogene* ، *Candida albicans* و *Asperigillus niger*. التي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل لغرض تحديد الفعالية التضادية لعزلات *Streptomyces* المعزولة.

اختبار الفعالية التضادية لعزلات *Streptomyces*

لغرض اختبار قابلية عزلة *Streptomyces* لإنتاج المضادات الحيوية تم استخدام طريقة الانتشار بواسطة اقراص الاكار (Agar discs diffusion method) [20].

تشخيص عزلة *Streptomyces* المنتخبة

تم تشخيص العزلة المنتخبة والتي أعطت أعلى تضاد ضد الفطر *Asperigillus niger* إلى مستوى النوع اعتماداً على الاختبارات التشخيصية [15.، 23، 22، 2،21]

تحضير اللقاح

حضر وسط اللقاح من مكونات وسط الإنتاج نفسها. ووزع في دوارق زجاجية مخروطية سعة (250) مل بواقع (50) مل لكل دورق عُقم ثم لُقح بنقل جزء (حملة لوب) من مزرعة بكتريا *Streptomyces* النامية على وسط اكار الاسبراجين والكليسيرول ثم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند $(28 \pm 1)^{o}$ سيليزية وبسرعة رج (140) دورة/ دقيقة لمدة (3) ايام.

الظروف الزرعية

حضر وسط انتاج المضادات الحيوية في دوارق زجاجية مخروطية سعة (250) مل بواقع (50) مل لكل دورق، سدت الدوارق بإحكام ثم عُقمت بجهاز المعقام، تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت باللقاح المحضر للعزلة المنتخبة بعمر ثلاثة ايام وبنسبة (2%) حجم/ حجم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند $(28 \pm 1)^{o}$ سيليزية وبسرعة رج (140) دورة/ دقيقة لمدة (7) ايام.

استخلاص المضاد الحيوي للعزلة المنتخبة ودراسة فعاليته البايولوجية

تمت عملية استخلاص المضاد الحيوي بطريقة محلول ايثايل استيت وحسب طريقة Sahin و Ugur [24] و Ilic وآخرون [19] ولغرض دراسة الفعالية البايولوجية للمادة المستخلصة تم استخدام طريقة الانتشار بالأقراص حيث حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatmann No. 1) بقطر (6) سم وغمرت بالمادة المستخلصة المذابة في الماء ثم جففت في الهواء ووضعت في اطباق حاوية على وسط الاكار المغذي والملقح ببكتريا (*S. aureus*) حُضنت الاطباق عند $(37 \pm 1)^{o}$ سيليزية لمدة (24) ساعة وتم قياس المنطقة الخالية من النمو للبكتريا والفطريات المختبرة.

تنقية المضاد الحيوي

بعد استخلاص المادة الفعالة اجريت عملية فصل المركبات التي تحتويها المادة المستخلصة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) إذ استخدمت الواح الطبقة الرقيقة Silica ge125×20 $40f$ 254 Merk plate سم. واستخدم محلول التشرب المتكون من بيوتانول: حامض الخليك: ماء بنسب 4 : 1 : 2 ثم اظهرت بقع المركبات المفصولة اما باستخدام التبخير بواسطة اليود أو تعريض اللوح للأشعة فوق البنفسجية تم قياس R_f للمادة المفصولة وتحديد الفعالية البايولوجية لها بقشط البقع من اللوح واستخلاص المادة الفعالة من البقع المقشوطة بواسطة الميثانول وثم ترشيح المحلول بواسطة ورق الترشيح واختبار فعالية المادة المستخلصة ضد انواع البكتريا والفطريات المختبرة بطريقة الانتشار بالأقراص ثم قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية [16] باستخدام جهاز المطياف UV. Visible Spectrophotmeter طراز Camspec M330 UK.

النتائج والمناقشة

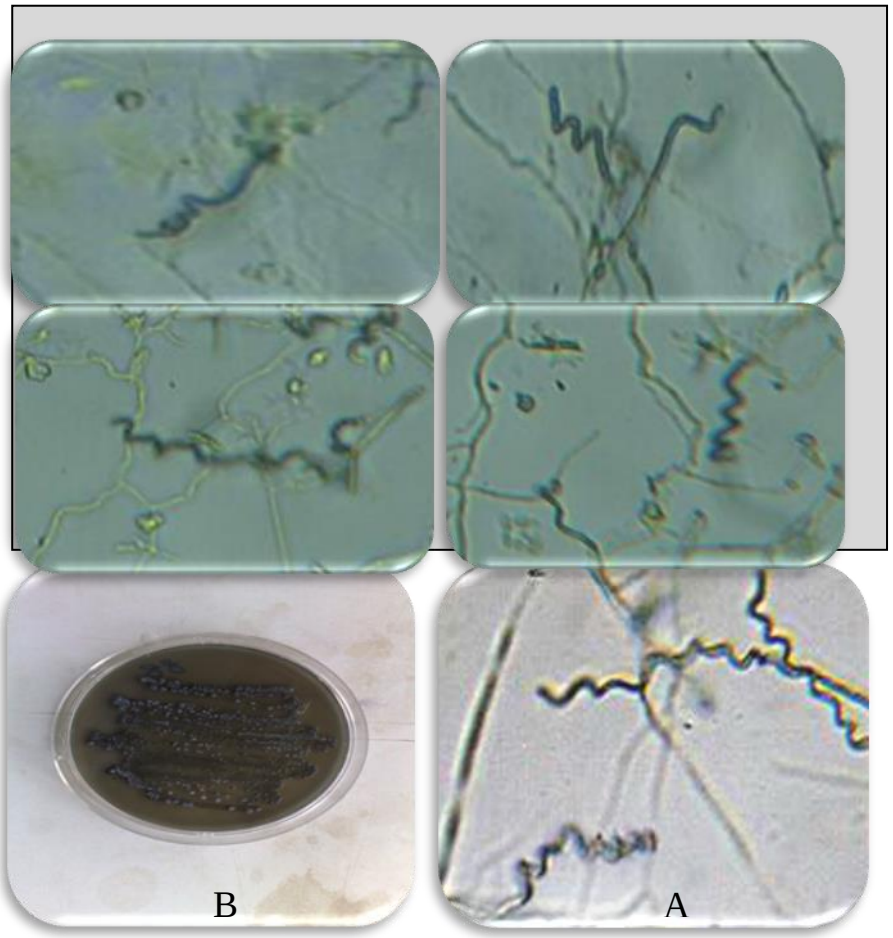
العزل

تم عزل 15 عزلة تابعة إلى جنس *Streptomyces* من (5) عينات ترب جمعت من مواقع مختلفة من حقول زراعية لمحافظة نينوى. اختيرت العزلة اعتماداً على المظهر الطباشيري للمستعمرة النامية على اوساط

العزل وانتاجها رائحة الأرض الرطبة [25،26] . وكانت لمعاملة التربة بمادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ نسبة (1:10)) وتجفيفها (40 – 45)^{o} سيليزية لمدة اربعة ايام دور كبير في زيادة اعداد عزلات جنس *Streptomyces* في العزل الأولي ذلك ان تجفيف التربة يؤدي إلى اختزال أعداد البكتريا الخضرية من جهة وان اضافة كاربونات الكالسيوم تؤدي إلى رفع قيمة الاس الهيدروجيني الامر الذي يؤدي إلى تحديد نمو معظم الفطريات من جهة اخرى وبذلك تنمو البكتريا الخيطية.[27]

التشخيص

شخصت العزلات التابعة إلى جنس *Streptomyces* باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية إذ تُعد هذه من افضل الطرق في التشخيص على مستوى الجنس لما لها من دور في اظهار ممثل الغزل الأرضي والهوائي والذي يميز الاجناس التابعة للبكتريا الخيطية عن بعضها البعض [2]. يتميز الغزل الأرضي للعزلات بكونه شديد التفرع وغير مقسم ولا يحمل سبورات، بينما ظهر الغزل الهوائي بشكل خيوط غامقة وأكثر سمكاً وأقل تفرعاً من الغزل الأرضي شكل (1A). يحمل الغزل الهوائي سلسلة طويلة من السبورات المحاطة بغمد ليفي يسمى (Sporophore) وتأخذ اشكالاً مختلفة حسب ترتيب السبورات فأما ان تأخذ شكلاً مستقيماً (Rectus) أو حلزونياً (Spiral) أو مستقيماً ذات نهاية معقوفة (Retinaculum – Apertum) أو مستقيماً متموجاً Rectus (Flexibilis –) [28]. وتتباين العزلات في الوان الغزل الهوائي عند تكرار زرعها وتنميتها على اوساط مختلفة وعدم قدرتها على انتاج صبغة الميلانين وصبغات اخرى وكان اللون الرصاصي شكل (1B) هو السائد بين العزلات وتتفق هذه النتائج مع Saadoun وآخرون [28] .



شكل (A): (1) الشكل الحلزوني للسلاسل السبورات لعزلة *Streptomyces rimosus* بقوة تكبير 40X.

(B): الغزل الهوائي (الرصاصي) للعزلة *Streptomyces rimosus*.

انتاج المضادات الحيوية

تم انتخاب العزلة التي اعطت أعلى تأثير ضد البكتريا والفطريات المختبرة شكل (2) وتم تشخيصها إلى مستوى النوع بحسب الاختبارات التي اجريت [2،21، 22، 23، 15]. وكما مبين في الجدول (1) حيث تبين انها تعود على الأغلب إلى النوع *S. rimosus* علماً انها تعد من الأنواع الصعبة التشخيص [2].

شكل (2): تأثير المضاد الحيوي للعزلة المحلية على الفطر *A. niger*.

جدول (1): الاختبارات التشخيصية للعزلة المنتخبة.

الاختبارات	النتيجة
صبغة گرام	+
الصبغة المقاومة للحامض	–
شكل سلسلة السبور	حلزوني
لون الغزل الهوائي	رصاصي – ابيض
تكوين السبورات على الغزل الأرضي	–
انتاج الميلانين على وسط Tyrosine agar	–
الاختبارات الأنزيمية	
الكتاليز	+
الاوكسيديز	+
تحلل الميلانين	–
تحلل السثنين	+
اختزال اللترات	–
انتاج H_2S	–
تحلل النشا	+
تحلل الكازائين	–
انتاج انزيم DNase	+
تحلل اليوريا	+

استهلاك المصادر الكاربونية	
كلوكوز	–
فركتوز	+
سكروز	+
مانيتول	+
اثيوسيتول	+
مالتوز	+
كالكتوز	+
لاكتوز	+
زايلوز	+
نشا	++
دكستران	–
كليسرول	++
القدرة على النمو باستخدام تراكيز مختلفة من المواد الكيميائية	
(1.5%) NaCl	+
(3%) NaCl	+
(5%) NaCl	+
(7%) NaCl	–
(10%) NaCl	–
صوديوم ازايد (0.01%)	+
مثينول(0.1%)	–
القدرة على النمو في (45 º) سيليزية	–
القدرة على تثبيط نمو البكتريا الموجبة والسالبة	
B. subtilis	
S. aurous	
E. coli	
P. aeruginosa	
E. aerogene	
P. vulgaris	

القدرة على تثبيط نمو الخميرة والفطريات	
C. albicans	*C. albicans*
A. niger	*A. niger*
شكل النمو في الوسط السائل **Gasien starch**	شكل النمو في الوسط السائل Gasien starch
حساسية الـ *Streptomyces* للمضادات الحيوية	
R	Chloramphenicol

(30) مايكروغرام/مل	
Neomycin (30) مايكروغرام/مل	**R**
Rifampin (30) مايكروغرام/مل	**R**
Streptomycin (30) مايكروغرام/مل	**R**
Ampicillin (30) مايكروغرام/مل	**S**
Gentamycin (30) مايكروغرام/مل	**S**

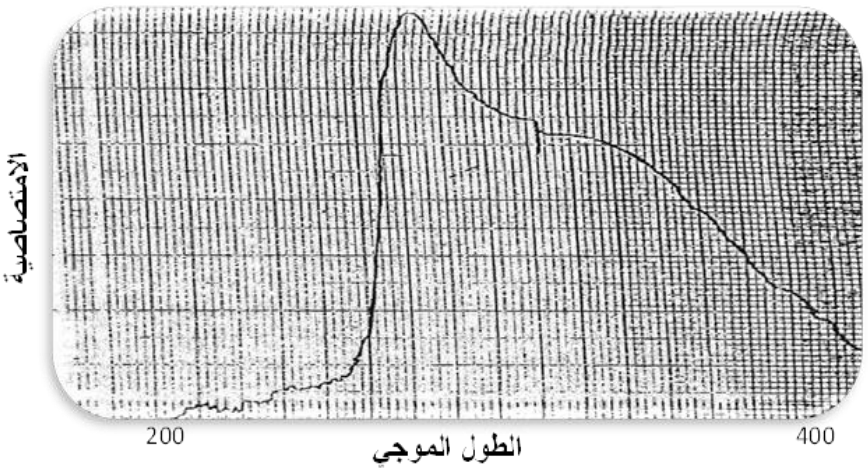
(–) سالب، (+) موجب، (R) مقاوم، (S) حساس.

تشخيص المضاد الحيوي

تم تشخيص المضاد الحيوي من قبل العزلة المنتخبة *S. rimosus* باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة إذ ظهر المضاد الحيوي بشكل بقعة واحدة فقط على لوح الفصل بعد تعرضه للأشعة فوق البنفسجية أو التبخير بوساطة اليود بقيمة (R_f) لها (0.5) حيث يمكن القول *S. rimosus* تنتج نوع واحد من المضادات الحيوية ذلك ان بعض انواع جنس *Streptomyces* تنتج اكثر من نوع واحد من المضادات الحيوية .[29]

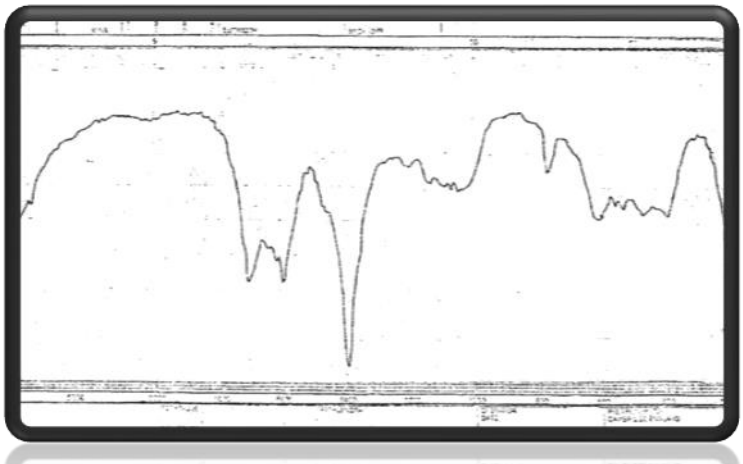
تم عزل المضاد الحيوي من البقعة الظاهرة على لوح الفصل حيث تبين انه قهوائي اللون.

تم قياس طيف الأشعة فوق البنفسجية للمضاد المذاب في الماء حيث اظهرت ذروة امتصاص عند الطول الموجي (294) نانوميتر شكل (3) ناتجة من حدوث الانتقالات الالكترونية عائدة إلى وجود الاواصر المزدوجة في تركيبة المضاد من نوع (C = O) و [30] (C =.) واعتماداً على [31] فان المضاد الحيوي المنتج من قبل *S. rimosus* يعود على الأغلب إلى مجموعة مضادات المايكروليد.



شكل (3): طيف الأشعة فوق البنفسجية للمضاد الحيوي المستخلص من العزلة المحلية *Streptomyces rimosus*.

من ملاحظة طيف الأشعة تحت الحمراء شكل (4) الذي يعتبر أهم الحزم الموجودة في المضاد الحيوي المستخلص، يلاحظ وجود حزمة مميزة لمجموعة الأمين (NH_2) المتداخلة معها حزمة الهيدروكسيل (OH–) عند الموقع (3420) سم$^{-1}$، ووجود آصرة (C =) الاروماتية التي تظهر حزمتها بحدود (3120) سم$^{-1}$. ويحتوي المركب ايضاً على الآصرة (C = O) الكاربونيلية العائدة إلى مجموعة الامايد، وتظهر حزمتها عند الموقع (1710) سم $^{-1}$تتداخل معها الآصرة (C = N) الاروماتية عند نفس الموقع، ويلاحظ من خلال الطيف ايضاً وجود حزمة معتدلة الشدة في الموقع (1600) سم $^{-1}$تعود إلى الآصرة الثنائية (C = C)، ووجود حزمة قوية الشدة في الموقع (1400) سم $^{-1}$تدل على آصرة (C – N) ضمن تركيبة المضاد الحيوي. ان ظهور تلك الحزم في طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي الجديد يتوافق مع أهم حزم الامتصاص الظاهرة في طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المعزول من *S. rimosus*



شكل (4): يوضح طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المستخلص للعزلة *Streptomyces rimosus*

References

1) Vercesi, A.; Nasini, G. and Locci, R. (1992). Actinomyces Vol. 3, No. 1.
2) Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. Bergey's (1994). Williams and Wilkins, Baltimore, U. S. A.
3) Ifaat, H. M. (2003). Journal of Mediterranean Ecology Vol. 4, No. 3 – 4.
4) Gilberto, H. (1983). Ph. D. Thesis. Swiesfedral institnte of technology Zaerich.
5) Todar, K. (2008). University of Wisconsin Madison Department of bacteriology.
6) Cross, T. and Good fellow. M. (1984). In (Sykes, G. and Skinner, F. A. eds.) pp. 11 – 112. Actinomycetales, Characteristics and Practical importance. Academic press, London. New York.
7) Locci, R. (1989). In (Williams, T. T.; Showp, M. E. and Holt, J. G. eds). 4: 2451 – 2508. Bergeys of manual of systemic bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
8) Rao, K. V.; Marsh, W. S. and Renn, D. W. (1969). U. S. Part. 862, 423, 398.
9) Haque, S. F.; Sen, S. K. and Pal, S. C. (1993). Indian Biologist. 25(1): 51 – 55.
10) Egorov, N. S. (1985). Antibiotics. A Scientific Approach. Mir Publishers, Moscow, Russia.
11) Rao, K. V. and Renn, D. W. (1963). Antimicrobial agents. Chemotherapy. 77. Rao, K. V. (1968). J. Med. Chem. 11. 939.

12) Al-Obaidi, S. I. (2012). Isolation of Different Local Species of the Genus Streptomyces and Study of their Antimicrobial Activity Identification by Biochemical Tests and Obtaining of Genetic Variation of Isolates by PCR RAPD Technique. Ph.D. Thesis, College of Education, University of Mosul. Mosul, Iraq.
13) Geylan, O.; Okmen, G. and Uzgur, A. (2008). Eurasia J. Bio. Sci. 2: 73 – 82.
14) Kuster, E. and Williams, S. T. Nature. 202: 928 – 929.
15) Oskay, M.; Tamer, U. and Azeri, C. (2004). Afr. J. Biotechnol. 3: 221 – 446.
16) Williams, S. T. and Cross, T. (1971). In Method in Microbiology. Vol. 4 Booth, C. pp295.
17) Wu, R. Y. and Chen, M. H. (1995). Bot. Bull. Acad Sin., 36: 201 – 205.
18) Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. (1985). Washington, USA.
19) Ilic, S. B.; Konstantinovic, S. S. and Todorovic, Z. B. (2005). Series: Medicine and Biology, 12: 44 – 46.
20) Egorov, N. S. (1992). MIR Publishers, Moscow; 62 – 75 and 132 – 176.
21) Williams, S. T.; Goodfellow, M.; Wellington, E. M. H.; Vickers, J. C.; Alderson, G.; Sneath, P. H. A.; Sackin, M. J. and Mortimer, A. M. (1983). J. Gen. Microbiol. 129: 1815 – 1830.
22) Pridham, T. G. and Gottleib, D. (1984). J. Bacteriol., 56: 107 – 114.
23) Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. (1981). Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G.; Balows, A. and Schlegel, H. G. (eds). Vol. 1, Springer – Verlag.
24) Sahin, N. and Ugur, A. (2003). Turk. J. Biol. 27: 79 – 84.
25) Carpenter, P. L. (1977). W. B. Saunders Comp.; U. S. A.
26) Alexander, M. (1977). John wiley and Sons.
27) Nahar, H., S.; Marof, B. Al-Deen and Al-Mahana, A. N. (1997). Babel university, 3:201-208.
28) Saadoun, I.; Al – Momani, F.; Malkawi, H. and Mohammad, M. J. (1999). Microbios., 100: 41 – 46.
29) Waksman, S. A. (1967). The Actinomyces. A summary of current knowledge.
30) Lambert, J. B.; Herbert, F. S.; Davied, L.; Grahamcooks, R. (1987). Macmillan Publishing Company / New York. Macmillan Publishers / London.
31) Berdy, J. (1980). Hand Book of Antiibiotic compound Vol. 11. Macrocyclic Lacton (Lactam) Antibiotics.