สารต้านจุลินทรีย์หลากกลุ่มจาก *Streptomyces coerulescens* NN91

Broad-spectrum Antimicrobial Compounds from *Streptomyces coerulescens* NN91

นันทวุฒิ นิยมวงษ์ *

Nanthavut Niyomvong *

สาขาวิชาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จ. นครสวรรค์ 60000

Department of Biology and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University, Nakhon Sawan 60000, Thailand

**Corresponding author: Email: nanthavut.ni@nsru.ac.th*

(Received: 12 May 2021; Accepted: 21 September 2021)

Abstract: This research aims to investigate the compounds from *Streptomyces coerulescens* isolate NN91 which showed the good activity against *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, and *Staphylococcus aureus*. The cultivation of this strain in ISP2 in shake flask at room temperature (28 °C) showed the bioactive compound activity at the maximum value at day 7 against test organisms and exhibited thermal stabilities at 100 °C for 15 minutes. Following supernatant extraction, crude extract showed a minimal inhibitory concentration (MIC) with *M. luteus* and *S. aureus* by 0.039 and 0.009 µg / ml, respectively. Molecular identification by sequencing of *16S rRNA* gene revealed that the actinomycete isolate NN91 was similarity to *S. coerulescens* (AB184122) with 98.9 %. This result can be applied for drug development and broad-spectrum susceptible treatment in near future.

Keywords: *Streptomyces coerulescens*, bioactive compound, MIC

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: งานวิจัยในครั้งนี้มุ่งศึกษาสารที่ผลิตได้จากแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลทนี้ในอาหารเหลวชนิด ISP2 และบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28 ˚C) พบว่า เชื้อสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้สูงสุดในวันที่ 7 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ มีความคงทนต่ออุณหภูมิ 100 ˚C เป็นเวลา 15 นาที สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อ *M. luteus* และ *S. aureus* ที่ 0.039 และ 0.009 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* ของแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *S. coerulescens* (AB184122) ที่ 98.9 % สารที่ผลิตจากไอโซเลท NN91 จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาตัวยาหรือสารต้านการติดเชื้อแบบหลากกลุ่มได้ในอนาคต

คำสำคัญ: *Streptomyces coerulescens* สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ MIC

บทนำ

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญแบบเส้นสาย (filamentous bacteria) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ รากพืช ในถ้ำ หรือบริเวณที่มีการเน่าเปื่อยของอินทรียสารต่าง ๆ (Niyomvong *et al*., 2012) แอคติโนมัยสีทมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศในฐานะผู้ย่อยสลายอินทรียสาร เนื่องด้วยมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรียวัตถุ เช่น เซลลูโลส หรือเฮมิเซลลูโลสในพืช เป็นต้น ผลจากการย่อยทำให้ดินมีสารอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่อระบบนิเวศวิทยาของดิน (Alexander, 1977)

นอกจากบทบาทของผู้ย่อยสลายอินทรียสาร แอคติโนมัยสีทยังมีบทบาทสำคัญในแง่ของการผลิตสารปฏิชีวนะที่ใช้ทางการแพทย์ เช่น กลุ่ม streptomycetes, actinoplanete และ nocardioform (Okami and Hotta, 1988) โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* นั้น มีบทบาทสำคัญทางเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยระหว่างการเจริญมักสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารปฏิชีวนะรวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ออกมานอกเซลล์หลายชนิด (Maleki *et al*., 2013) จึงทำให้เกิดการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1943 ที่ได้ค้นพบยาปฏิชีวนะ streptomycin จาก *Streptomyces griseus* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากนั้นก็มีการค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ตามมา เช่น neomycin, cypemycin, grisemycin, bottromycins และ chloramphenicol ซึ่งเมื่อพิจารณาจำนวนพบว่า 2 ใน 3 ของยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติที่ใช้ทางการแพทย์ที่ได้นั้นได้มาจาก *Streptomycetes* เป็นหลัก (Olano *et al*., 2009) และจากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดกว่า 23,000 ชนิด ได้มาจากแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ทั้งสิ้น ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่เป็นที่รู้จักและได้จากสกุล *Streptomyces* ได้แก่ ยา chloramphenicol ผลิตโดย *Streptomyces venezuelae* ยา aureomycin และ tetracycline ผลิตโดย *Streptomyces aureofacien* ยา neomycin ผลิตโดย *Streptomyces fradiae* และ ยา kanamycin ผลิตโดย *Streptomyces kanamyceticus* เป็นต้น (Lazzarini *et al*., 2000)

ด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้มีการศึกษาและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นพบ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย หรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ ๆ ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการแพทย์และเกษตรกรรมต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์จาก *Streptomyces* ที่ได้รับความนิยมวิธีหนึ่งคือการสกัด

(extraction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ และทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในระดับหนึ่ง โดยมีการเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัดของเหลวทั้งสองชนิดเมื่อผสมกันจะกลายเป็นสารละลายผสมแยกชั้น (immiscible) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัดที่ละลายในน้ำเลี้ยงเซลล์จะละลายเข้าสู่ตัวทำละลายที่ใช้ จนกระทั่งกระบวนการแยกสมบูรณ์จนได้สารที่ต้องการในปริมาณที่เข้มข้นมากพอผสมอยู่กับตัวทำละลาย จากนั้นทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยหรือนำไปกลั่นต่อไปจนได้สกัดสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ระดับออกฤทธิ์ทางชีวภาพในที่สุด ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวได้สารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งยีสต์ก่อโรคได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะที่ได้จากสารสกัดหยาบจาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ MJ502-77F8 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Klebsialla pneumoniae, Micrococcus luteus Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris* และ *Salmonella typhymurium* (Sasaki *et al*., 1997) สารสกัดหยาบจาก *Nocardiopsis dassonvillei* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ดี (Schumacher *et al*., 2001) หรือสารสกัดหยาบจาก *Streptosporangium* สายพันธุ์ Sg 10 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบคือ *Micrococcus luteus* และรา *Mucor ramannianus* เป็นต้น (Boudjella *et al*., 2006)

งานวิจัยในครั้งนี้ มุ่งทดสอบแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NN91 ที่คัดแยกได้จากดินถ้ำในประเทศไทย เพื่อนำมาศึกษาการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* TISTR 884 และยีสต์ทดสอบ คือ *Candida albicans* BCC 5390 และเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 เพื่อศึกษาระยะเวลาที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด รวมทั้งความคงตัวต่อความร้อน และหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) จากสารสกัดหยาบที่ได้ รวมทั้งศึกษาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* เพื่อจัดจำแนกชนิดของไอโซเลทดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลท NN91 ด้วยวิธี agar - streak tests

ไอโซเลท NN91 คัดแยกจากดินถ้ำในจังหวัดนครสวรรค์ (15°56'14.8"N 99°52'39.0"E) ด้วยอาหาร starch casein agar นำเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอร์รอล 20% แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน การทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี agar - streak tests ทำโดยเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง ISP2 ลาก (streak) เป็นแนวให้มีความกว้าง 0.63 เซนติเมตร ยาว 7.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ก่อนนำจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *E. coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *M. luteus* TISTR 884 และ *C. albicans* BCC 5390 ลากให้มีความกว้าง 0.63 เซนติเมตร ทำมุม 90 องศากับแนวแอคติโนมัยสีท ตรวจผลการยับยั้งหลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยดูบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่างรอยขีดของแอคติโนมัยสีทและจุลินทรีย์ทดสอบ (Lyons and Pridham, 1971) ทำจำนวน 3 ซ้ำ บันทึกระยะการยับยั้งและหาค่าสถิติ

ศึกษาการเจริญของเซลล์และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลท NN91 ในอาหารเหลว

เลี้ยงแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 ลงบนอาหาร ISP3 เป็นเวลา 7 วัน โดยขูดสปอร์ลงใน 1/4 ringer solution นับจำนวนสปอร์ด้วย hemacytometer เจือจางให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสปอร์แขวนลอยจำนวน 1 มิลลิลิตร (2 %) ลงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (seed inoculum) ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง หาน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของการบ่ม โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงซ้ำที่สภาวะเดิม นำเซลล์ที่ปั่นแยกมาอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 วัน ชั่งน้ำหนักแห้ง (Sengupta *et al*., 2015) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ของแต่ละวันมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ส่วนยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YM (yeast malt extract broth) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น (turbidimetric method) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.25 ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อจุ่มเซลล์แขวนลอยจุลินทรีย์ทดสอบที่ได้ความเข้มข้นที่ปรับไว้ได้ เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง NA หรือ YM ให้สม่ำเสมอ แล้ววาง paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ที่หยดน้ำเลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ วางลงบนผิวหน้าอาหารนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเพื่อหาค่าสถิติ

ศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 ลงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายภาพโคโลนีบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และส่องดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) กำลังขยาย 500 เท่า (500 X) เพื่อส่องตัวอย่างจากจานเพาะโดยตรง โดยไม่ทำให้เส้นใยและสปอร์ของแอคติโนมัยสีทเสียหายจากการเตรียมสไลด์

การศึกษาความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเซลล์ของไอโซเลท NN91

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 และ 13 ของการบ่มแบบเขย่านำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ความคงตัวของสารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของแต่ละวัน นำน้ำเลี้ยงเซลล์ของวันที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด จากการทดลองในข้อที่ 7 มาเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบความคงตัวต่อความร้อนที่ 100 °C โดยเพิ่มเวลาการบ่มมากขึ้นเป็น 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการบ่มแล้วที่เวลาต่าง ๆ ไปทดสอบยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งวิธีวัดความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ทำเหมือนกับข้อที่ 2 (การศึกษาการเจริญของเซลล์ และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ)

การเตรียมสารสกัดหยาบและการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

เตรียมเชื้อตั้งต้น (seed inoculum) ของไอโซเลท NN91 ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าชนิดที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออก นำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 - 3 นาที ใช้กรวยแยก (separatory funnel) เก็บส่วนเอทิลอะซีเตทแล้วนำ supernatant มาสกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1 : 1 นำส่วนเอทิลอะซิเตท ทั้งหมดมารวมกัน ระเหยเอาเอทิลอะซิเตทออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 °C จนหมด นำสารสกัดหยาบที่ได้ ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาหาค่า MIC ด้วยวิธี macrodilution (Siddiqi *et al*., 1993) มีวิธีการดังนี้คือ เตรียมหลอดอาหาร NB ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 15 หลอด เติมสารสกัดหยาบ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ลงในหลอดแรก ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นดูดสารผสม

จากหลอดแรก เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ทำการเจือจางเช่นเดียวกันนี้ในหลอดที่ 3 ถึง 15 ดูดสารละลายในหลอดสุดท้าย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไป ใช้ autopipette เติมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียทดสอบ (เลี้ยงในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปรับความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.25) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทั้ง 15 หลอด ทำให้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบหลอดที่ 1 ถึง 10 คือ 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019 และ 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีชุดควบคุมที่มีทั้งหลอดที่เติมสารสกัดหยาบ (positive control) และไม่เติมสารสกัดหยาบ (negative control) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 °C ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ โดยตรวจสอบความขุ่น (turbidity) ของหลอดเชื้อเป้าหมายกับหลอดควบคุมทั้งสองหลอด โดยในหลอดที่พบความขุ่น (Figure 1) คือการบ่งชี้การเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดในหลอดที่จุลินทรีย์ทดสอบไม่สามารถเจริญได้ คือ ค่า MIC บันทึกผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยคำนวณเทียบกับปริมาณสารสกัดที่มีอยู่ในหลอดนั้น ๆ

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rRNA*

สกัดดีเอ็นเอของแอคติโนมัยสีทตามวิธีของ Kieser *et al*. (2000) เพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-'3, M = C:A) และไพรเมอร์ 1525R (5'AAGGAGGTGWTCCARCC- '3, W = A:T และ R = A:G) (Lane, 1991) ด้วย PCR (Gene Amp® PCR System 9700) ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และหาลำดับเบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank /EMBL/ DDBJ โดยใช้ BLASTn program และ alignment software (CLUSTAL W program package)

ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลท NN91 ด้วยวิธี agar - streak tests

ไอโซเลท NN91 สร้างระยะยับยั้งต่อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* TISTR 884 ได้มากกว่า 50 มิลลิเมตร ส่วน *C. albicans* BCC 5390 มีระยะยับยั้งที่ 36 มิลลิเมตร แต่ไม่พบการยับยั้งต่อ *E. coli* ATCC 8739 บนอาหารแข็ง

การเจริญของเซลล์และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลท NN91 ในอาหารเหลว

พบว่า ไอโซเลท NN91 เริ่มมีการเจริญในอาหารเหลวระหว่างวันที่ 2 ถึงวันที่ 3 ในช่วงปลายของระยะนี้จะมีการเจริญเพิ่มน้ำหนักแห้งมากขึ้น เมื่อการบ่มดำเนินเข้าสู่วันที่ 4 ถึงวันที่ 5 พบว่า มีการเจริญของเซลล์อย่างรวดเร็ว จากนั้นน้ำหนักเซลล์จะยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงวันที่ 5 และวันที่ 7 แต่เมื่อการเจริญผ่านในวันที่ 8 ปริมาณเซลล์จะเริ่มลดลง

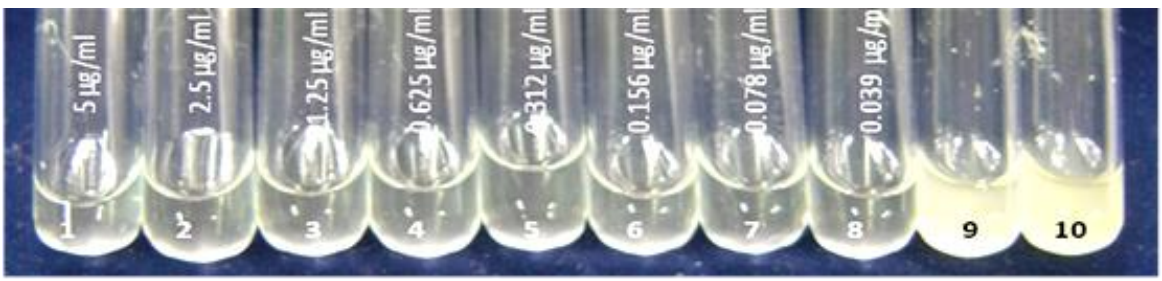


Figure 1. Example of minimum inhibitory concentration (MIC) assay of actinomycetes isolate NN91 against *Micrococcus luteus*, tube No. 9 and 10 showed the growth of microbial test while tube No. 8 showed the minimum inhibitory concentration

อย่างต่อเนื่อง เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการยับยั้งต่อ *E. coli* พบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ในช่วง 3 - 13 วัน มีบริเวณยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 1 และ 2 วัน ส่วนการทดสอบการยับยั้งต่อ *S. aureus* พบว่า ทุกระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ให้ผลต่อบริเวณยับยั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 11 วัน สามารถยับยั้งได้มากที่สุด ส่วนการยับยั้งต่อ *M. luteus* พบว่า การเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 5, 7 และ 13 ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์อื่น ๆ ส่วนการยับยั้ง *C. albicans* พบว่า การเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 7 และ 11 ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์อื่น ๆ (Table 1)

ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเซลล์ของไอโซเลท NN91

น้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NN91 มีความคงตัว เมื่อบ่มที่ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันที่พบการยับยั้งสูงสุดในจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดมาเพิ่มเวลาการบ่ม เป็นเวลา 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มความกว้างของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำเลี้ยงเซลล์ มีแนวโน้มที่ลดลง (Table 2) โดยพบว่า ความสามารถในการยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเลี้ยงเซลล์ควบคุมในทุกเชื้อทดสอบ

สัณฐานวิทยาของไอโซเลท NN91

หลังเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 ลงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสัณฐานวิทยาการเจริญบนผิวอาหาร ISP2 มีโคโลนีสีขาวคล้ายจุดแป้ง และเมื่อตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยาย 500 เท่า พบว่า มีรูปร่างสปอร์ชนิดเกลียว (spiral) ดังแสดงใน Figure 2 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสกุล *Streptomyces*

Table 1. Cell dry weight and antimicrobial activity of supernatant from actinomycetes isolate NN91

Time (day)	Cell dry weight (g)	Inhibition zone diameter (mm)			
		E. coli	*S. aureus*	*M. luteus*	*C. albicans*
1	0.033 ± 0.015	0.00 ± 0.00^{c}	1.66 ± 0.01^{f}	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
2	0.039 ± 0.010	4.66 ± 0.03^{b}	3.67 ± 0.07^{e}	3.33 ± 0.03^{e}	0.00 ± 0.00^{f}
3	0.042 ± 0.010	5.32 ± 0.02^{a}	4.07 ± 0.12^{d}	4.66 ± 0.01^{d}	2.66 ± 0.01^{e}
4	0.052 ± 0.007	5.33 ± 0.02^{a}	4.07 ± 0.06^{d}	5.33 ± 0.01^{c}	3.65 ± 0.01^{d}
5	0.079 ± 0.002	5.33 ± 0.08^{a}	6.32 ± 0.02^{c}	9.66 ± 0.01^{a}	4.66 ± 0.02^{c}
7	0.081 ± 0.002	5.33 ± 0.01^{a}	8.00 ± 0.10^{b}	**9.66 ± 0.00^{a}**	**5.33 ± 0.01^{a}**
9	0.067 ± 0.002	5.29 ± 0.08^{a}	8.03 ± 0.15^{b}	9.34 ± 0.01^{b}	5.03 ± 0.06^{b}
11	0.054 ± 0.008	5.30 ± 0.05^{a}	**8.33 ± 0.01^{a}**	9.33 ± 0.01^{b}	**5.33 ± 0.00^{a}**
13	0.040 ± 0.004	5.30 ± 0.06^{a}	8.00 ± 0.10^{b}	**9.66 ± 0.01^{a}**	5.00 ± 0.10^{b}

Mean ± SE within the same column follow by different letters showed significantly different at $p \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 2. Antimicrobial activity of actinomycetes isolate NN91 supernatant (7 - day cultivation) after boiling at 100 °C

Boiling time (min)	Inhibition zone diameter by three replica (mm)			
	E. coli	*S. aureus*	*M. luteus*	*C. albicans*
0	5.33 ± 0.01[a]	8.33 ± 0.06[a]	9.66 ± 0.01[a]	5.32 ± 0.02[a]
15	5.33 ± 0.01[a]	8.33 ± 0.01[a]	9.66 ± 0.10[a]	5.33 ± 0.01[a]
30	0.00 ± 0.00[b]	5.50 ± 0.10[d]	5.63 ± 0.25[c]	3.00 ± 0.00[b]
45	0.00 ± 0.00[b]	5.80 ± 0.10[c]	4.50 ± 0.20[de]	2.53 ± 0.15[c]
60	0.00 ± 0.00[b]	5.13 ± 0.06[e]	4.63 ± 0.06[d]	2.60 ± 0.00[c]
70	0.00 ± 0.00[b]	4.33 ± 0.15[f]	4.60 ± 0.00[d]	0.00 ± 0.00[d]
90	0.00 ± 0.00[b]	4.53 ± 0.25[f]	4.30 ± 0.10[e]	0.00 ± 0.00[d]
105	0.00 ± 0.00[b]	4.30 ± 0.10[f]	4.53 ± 0.06[d]	0.00 ± 0.00[d]
120	0.00 ± 0.00[b]	3.60 ± 0.20[g]	4.53 ± 0.06[d]	0.00 ± 0.00[d]

Mean ± SE within the same column follow by different letters showed significantly different at $p \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test

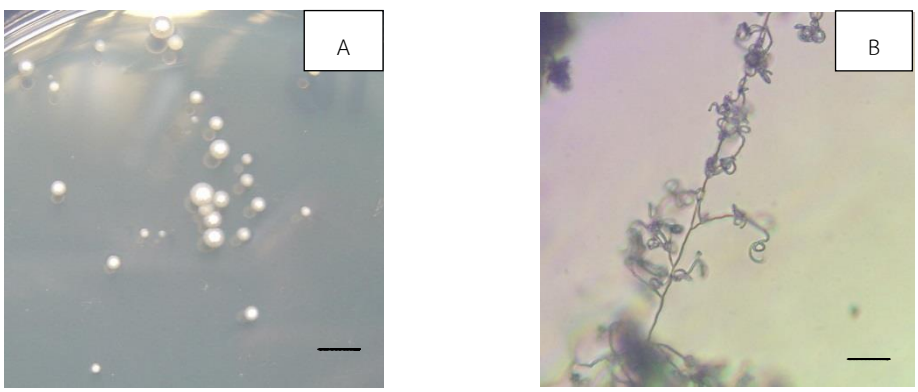


Figure 2. Morphology of Isolate *Streptomyces coerulescens* NN91

A) colony on ISP2, 7 days (scale bar 1 mm) B) aerial mycelia (scale bar 10 µm)

ค่า minimum inhibitory concentration ของสารสกัดหยาบแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NN91

ผลของการใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า MIC ต่อการเจริญของ *M. luteus* เท่ากับ 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* คือ 0.009 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rRNA*

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rRNA* บางส่วน (partial sequence) จำนวน 720 คู่เบส (bp) พบว่า ไอโซเลท NN91 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces coerulescens* NBRC 12758^T (AB184122) ที่ 98.9 % จึงให้ชื่อว่า *Streptomyces coerulescens* ไอโซเลท NN91

วิจารณ์

ไอโซเลท NN91 สามารถต้านการเจริญของ *C. albicans* BCC 5390, *M. luteus* TISTR 884 และ *S. aureus* ATCC 25923 ทั้งอาหารแข็งและในอาหารเหลวได้ดี แต่พบการยับยั้งต่อ *E. coli* ATCC 8739 ในอาหารเหลวเท่านั้น อาจเป็นเพราะความแตกต่างของการเลี้ยงในอาหารทั้งสองแบบ การเลี้ยงบนอาหารเหลวที่มีอัตราการให้อากาศอย่างสม่ำเสมอ อาจทำให้ *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 สร้างสารบางชนิด ที่ไม่ผลิตออกมาเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานว่าสารปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน (vancomycin) ถูกสร้างจาก *Amycolatopsis orientalis* ในสภาวะให้อากาศเท่านั้น ดังนั้น ออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์จากแอคติโนมัยสีท (Clark *et al*., 1995) ในเมื่อพิจารณาการเจริญในอาหารเหลวภายใต้สภาวะแบบเขย่า พบว่า *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 เริ่มมีการเจริญระหว่างวันที่ 2 ถึงวันที่ 3 โดยการเจริญของเซลล์เป็นไปอย่างช้า ๆ ต่อมาในช่วงปลายของระยะนี้มีการเจริญเพิ่มน้ำหนักแห้งมากขึ้น เมื่อการบ่มดำเนินเข้าสู่วันที่ 4 ถึงวันที่ 5 พบว่า มีการเจริญของเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นการเจริญแบบ exponential จากนั้นน้ำหนักเซลล์ยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงวันที่ 5 และวันที่ 7 ซึ่งเป็นช่วง stationary phase ซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงสุดและคงที่ แต่เมื่อการเจริญผ่านในวันที่ 8 ปริมาณเซลล์เริ่มลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอยู่ในช่วง decline phase เนื่องจากแหล่งอาหารเริ่มหมดลง รวมทั้งสารที่เป็นของเสียที่สะสมจากกระบวนการเมแทบอลิซึมไปมีผลต่อการเจริญ จากข้อมูลพบว่า น้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับบริเวณยับยั้งที่กว้างขึ้น อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในบางวันมีค่าเพิ่มขึ้น จากนั้นจะลดลงเล็กน้อยในวันต่อมา เช่น *S. aureus* และ *C. albican* ในวันที่ 11 หรือ *M. luteus* ในวันที่ 13 อาจเป็นเพราะสภาวะการเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้เป็นการให้อากาศด้วยเครื่องเขย่าแบบไม่มีอุปกรณ์ควบคุมอุณภูมิ ทำให้อุณหภูมิห้องสามารถเปลี่ยนแปลงได้ เป็นปัจจัยส่งผลต่อค่าการยับยั้งของสารออกฤทธิ์หรืออาจเกิดปฏิกิริยาบางอย่างตามธรรมชาติระหว่างสารมากกว่า 1 ชนิดในน้ำเลี้ยงเซลล์ ค่าการยับยั้งจึงไม่สัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์ตามทฤษฎีอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาต่อไป

เมื่อเพิ่มเวลาการบ่ม supernatant ที่ 100 °C เป็นเวลา 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม ความกว้างของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำเลี้ยงเซลล์ มีแนวโน้มที่ลดลง จากผลที่ได้ทำให้กล่าวได้ว่า ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 ต่อความร้อนที่ 100 °C นั้น มีความคงตัวอยู่เพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น พบว่า ที่ความร้อนที่ 100 °C ในระยะเวลา 15 นาที สามารถคงความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์ได้ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 30 นาที จะเริ่มสูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้ง *E. coli* ไป ส่วนคุณสมบัติในการยับยั้ง*ต่อ S. aureus, M. luteus* และ *C. albicans* เริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาในการให้ความร้อนผ่านไป 70, 45 และ 70 นาที ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานว่า สารต้านจุลินทรีย์ที่พบใน streptomyces หลายชนิด เป็นสารในกลุ่มเอนไซม์ เช่น ไคติเนส (chitinase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เสียสภาพได้เมื่อผ่านความร้อนสูงเป็นระยะเวลานาน (Narayana and Vijayalakshmi, 2009)

ค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *M. luteus* ของการทดลองครั้งนี้ เท่ากับ 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *M. luteus* ของแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Streptomyces จากงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Atta *et al*. (2009) ได้เลี้ยง *Streptomyces* sp. AZ-NIOFD1 ในอาหารเหลวและสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย พบว่า ค่า MIC ของสารนี้ต่อ *M. luteus* มีค่าเท่ากับ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่างานวิจัยในครั้งนี้ หรือตัวอย่างงานวิจัยของ Selvin *et al*. (2004) ได้คัดแยก *Streptomyces* sp. (BTL7) จากฟองน้ำทะเล *(Dendrilla nigra)* จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สกัดโดยใช้ hexane dichloromethane

และ methanol เป็นตัวทำละลาย หาค่า MIC ต่อ *M. luteus* พบค่าเท่ากับ 44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่า สารสกัดจาก *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 ของงานวิจัยในครั้งนี้ มีประสิทธิภาพที่สูงกว่างานทดลองที่ผ่านมาซึ่งเป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแหล่งอื่น ๆ โดยความเข้มข้นของสารเพียง 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* ได้ เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* กับงานวิจัยชิ้นอื่นพบว่า งานวิจัยของ Arasu *et al*. (2008) รายงานว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* spp. ไอโซเลท ERI-26 มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* มากกว่า 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในทุกส่วนสกัด (fractions) จากการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 ที่มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าสารสกัดจาก *Streptomyces* spp. ไอโซเลท ERI-26 เป็นอย่างมาก

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของค่า MIC ของสารสกัดหยาบจาก *S. coerulescens* ไอโซเลท NN91 ที่ได้ กับงานวิจัยอื่น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น ชนิดและการเจริญของของแอคติโนมัยสีทที่นำมาเลี้ยงและสกัด อาหารที่ใช้ในการเลี้ยง สภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารที่ใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแต่ละชนิดนั้น มีคุณสมบัติในการชะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้แตกต่างกัน จึงต้องมีการพิจารณาเลือกใช้ตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดด้วย

สรุป

งานวิจัยในครั้งนี้พบว่า แอคติโนมัยสีท ไอโซเลท NN91 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 8739 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* TISTR 884 และยีสต์ทดสอบ คือ *C. albicans* BCC 5390 ได้เป็นอย่างดี โดยระยะเวลา 7 วัน สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารเหลว ISP2 ได้ดีที่สุด สารออกฤทธิ์ดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมดได้ ถึงแม้ว่าจะผ่านความร้อน 100 °C เป็นเวลาถึง 15 นาทีก็ตาม และพบว่าประสิทธิภาพลดลงเมื่อใช้เวลาให้ความร้อนมากขึ้น โดยฤทธิ์การยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *M. luteus* ยังคงอยู่ ถึงแม้ว่าเวลาในการให้ความร้อนจะผ่านไปถึง 120 นาที ค่า MIC ต่อการเจริญของ *M. luteus* เท่ากับ 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* คือ 0.009 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* เพื่อจัดจำแนกชนิดของไอโซเลทดังกล่าว พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *S. coerulescens* NBRC 12758^{T} (AB184122) ที่ 98.9 %

S. coerulescens ไอโซเลท NN91 มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถต้านได้ทั้งกลุ่มยีสต์ซึ่งเป็นยูคาริโอต และแบคทีเรียที่เป็นโปรคาริโอต แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบบหลากกลุ่มซึ่งถือว่ามีความพิเศษที่น่าสนใจ สามารถต่อยอดในทางการแพทย์หรือพัฒนาเป็นยาต้านจุลินทรีย์ในอนาคต โดยสารที่ได้อาจเป็นสารชนิดใหม่ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมี หรือกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ ดวงมาลย์ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนา สีสุข และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่ดูแลให้คำปรึกษาตลอดจนเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York. 467 p.

Arasu, M.V., V. Duraipandiyan, P. Agastian and S. Ignacimuthu. 2008. Antimicrobial activity

of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. Journal de Mycologie Médicale 18(3): 147-153.

Atta, H.M., S.M. Dabour and S.G. Desoukey. 2009. Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFD1: Taxonomy, fermentation, purification and biological activities. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science 5(3): 368-377.

Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research 161(4): 288-298.

Clark, G.J., D. Langley and M.E. Bushell. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. Microbiology 141: 663-669.

Kieser, T., M.J, Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich. 613p.

Lazzarini A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie Van Leeuwenhoek 78(3): 399-405.

Lyons, A.J. and T.G. Pridham. 1971. *Streptomyces torulosus* sp. n., an unusual knobby-spored Taxon. Applied Microbiology 22(2): 190-193.

Maleki, H., A. Dehnad, S. Hanifian and S. Khani. 2013. Isolation and molecular identification of *Streptomyces* spp. with antibacterial activity from northwest of Iran. BioImpacts 3(3): 129-134.

Niyomvong, N., W. Pathom-aree, A. Thamchaipenet and K. Duangmal. 2012. Actinomycetes from tropical limestone caves. Chiang Mai Journal of Science 39(3): 373-388.

Narayana, K.J.P. and M. Vijayalakshmi. 2009. Chitinase Production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. Brazilian Journal of Microbiology 40(4): 725-733.

Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. pp. 33-67. *In*: M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (eds.). Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, London

Olano, C., C. Mendez and J.A. Salas. 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. Marine Drugs 7(2): 210-248.

Sasaki, T., T. Otani, K. Yoshida, N. Unemi, M. Hamada and T. Takeuchi. 1997. Discovery of methyl-2-(2'-hydroxyphenyl)-2-oxazoline-4-carboxylate as a secondary metabolite from *Actinomadura* sp. Journal of Antibiotics 50(10): 881-883.

Schumacher, R.W., B.L. Harrigan and B.S. Davidson. 2001. Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. Tetrahedron Letters 42(31): 5133-5135.

Selvin, J., S. Joseph, K.R.T. Asha, W.A. Manjusha, V.S. Sangeetha, D.M. Jayaseema, M.C. Antony and A.L. Denslin Vinitha. 2004. Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. FEMS Microbiology Ecology 50(2): 117-122.

Sengupta, S., A. Pramanik, A. Ghosh and M. Bhattacharyya. 2015. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. BMC microbiology 15(1): 170, doi: 10.1186/s12866-015-0495-4

Siddiqi, S.H., L.B. Heifets, M.H. Cynamon, N.M. Hooper, A. Laszlo, J.P. Libonati, P.J. Lindholm-Levy and N. Pearson. 1993. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. Journal of Clinical Microbiology 31(9): 2332-2338.