

ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้

Effect of carbon and nitrogen sources on antibacterial substance production from isolated Actinomycetes

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง^{1*} และ สุกัญญา สาวเพชรดี¹

Sujidkanlaya Maruekarajitinplaeng^{1*} and Sukanya Sawpetdee¹

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีท์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีสมบัติโดดเด่นด้านความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารต้านการเจริญแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้ การศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างจากพื้นผิวโบสถ์และเจดีย์ วัดใหญ่ชัยมงคล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ด้วยอาหาร starch casein agar และทำการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 2372, *Escherichia coli* TISTR 527, *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1867, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ด้วยวิธี disc diffusion ผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลต 11J04 มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 สูงที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเท่ากับ 17 มิลลิเมตร และแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงไอโซเลต 11J04 คือ แป้งมันสำปะหลัง และโมโนโซเดียมกลูตาเมต การศึกษาครั้งนี้เป็นพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาปฏิชีวนะได้ในลำดับต่อไป

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท์ สารสี สารต้านแบคทีเรีย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abstract

Actinomycetes are Gram's positive bacteria that has the best ability to produce a bioactive compound that inhibited other bacterial growth. This research aimed to isolate, select and study the effect of carbon and nitrogen sources on anti-pathogenic bacterial substances from isolated actinomycetes. Actinomycetes were collected from archaeological site surface in Phranakhon Si Ayutthaya Province. Actinomycetes isolation was isolated using Starch Casein Agar (SCA). The anti-pathogenic bacterial activity was done against 5 pathogenic bacterial strains including *Bacillus cereus* TISTR 2372, *Escherichia coli* TISTR 527, *Klebsiella pneumonia* TISTR 1867, *Pseudomonas*

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

¹ Faculty of Science and Technology, Rajabhat Phranakhon Si Ayutthaya University

* Corresponding author. E-mail: Msujidkanlaya@aru.ac.th

Received: April 8, 2022; Revised: June 14, 2022; Accepted: August 3, 2022

aeruginosa TISTR 2370 and *Staphylococcus aureus* TISTR 746 using agar disc diffusion method. The results showed that isolate 11J04 had the highest activity on growth inhibition of *B. cereus* TISTR 2372 with a diameter of inhibition zone of 17 mm. The optimal carbon and nitrogen sources for growth of isolate 11J04 were casava starch and monosodium glutamate. This study is the basis study of the diversity of actinomycetes that produce bioactive compounds. This could be benefit for the next antibiotic development.

Keywords: Actinomycetes, pigments, antibacterial, bioactive compounds

บทนำ

แอคติโนมัยซีท เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสำคัญในด้านของความสามารถในการผลิตสารต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งได้ถูกพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในปัจจุบัน (Madigan, & Martinko, 2006) แอคติโนมัยซีทมีลักษณะการเจริญแบบเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ยกเว้นบางกลุ่ม เช่น genus *Micromonospora*, *Salinospora*, *Verrucosipora* จะสร้างแค่ส่วนของ substrate mycelium ตัวอย่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora* และ *Actinoplanes* (Watanadilok, Nareeboon, & Taweedes, 2015) อย่างไรก็ตามตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ยังคงมีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยก จำแนก ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และค้นหาคายภาพของเชื้อกลุ่มนี้อย่างต่อเนื่อง มีรายงานการวิจัยของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้านการผลิตสารต้านแบคทีเรีย เช่น สารสีเหลืองจาก *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ossamyceticus* strain D10 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *Klebsiella* sp. สารสีม่วงมีฤทธิ์ต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และ

เชื้อรา (Wang, Lei, Xiang, Jiang, & Yang, 2009) สารสีน้ำตาลเข้ม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* และ *C. freundii* (Azimi, Salehi, & Bahador, 2016) สารสีแดง มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* sp., *P. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* (Abraham, & Chauhan, 2018) และสารสีเขียว มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *S. aureus* (Azimi, Baserisalehi, & Bahador, 2014) รวมทั้งการศึกษาสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมแทบอลิไทต์ที่เชื้อกลุ่มนี้ผลิตขึ้น (AL Farraj et al., 2019; Niyomvong, 2021) กลไกการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง เช่น สายพันธุ์ของเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งธาตุอาหารหลัก เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารรองชนิดอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Saba, Salehi, & Nima, 2016; AL Farraj et al., 2019; Al Farraj et al., 2020)

แบคทีเรียก่อโรค มีหลายสายพันธุ์ มีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *E. coli* ก่อโรคอุจจาระร่วง *Bacillus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Salmonella* โดยเฉพาะ *Salmonella typhimurium* ก่อโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ *Shigella* ก่อโรคบิด

C. botulinum ก่อโรคโบทูลิซึม *C. perfringens* ก่อโรคเนื้อตายเน่า (myonecrosis) *S. aureus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษ *K. pneumoniae* ก่อโรคปอดอักเสบ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล บางสายพันธุ์นอกจากเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ รวมทั้งโรคอาหารเป็นพิษ ยังทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียนับว่าเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ (Ray, 2003) อีกทั้งในปัจจุบันยังพบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *E. coli* ดื้อต่อยา Penicillin และ Cephalosporins, *Sal. typhi* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside, carbapenem, cephalosporin, beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor และ quinolone, *K. pneumoniae* ดื้อต่อยา กลุ่ม Penicillin และ Cephalosporins, *P. aeruginosa* ดื้อต่อยา Amikacin, Ciprofloxacin และ Ceftazidime, *S. aureus* ดื้อต่อยา penicillin, Vancomycin และ Teicoplanin (Indrawattana, & Vanaporn, 2015) ซึ่งมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ต้องหาแหล่งของสารต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแหล่งใหม่เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อและลดอัตราการตายของผู้ป่วยติดเชื้อในโรงพยาบาล

วัดใหญ่ชัยมงคล มีสถาปัตยกรรมภายในวัดที่สำคัญ เช่น โบสถ์ เจดีย์ ศาลา ฯลฯ โบสถ์มีหลังคาไม่สูงมาก มีพระพุทธรูปทำจากปูนปั้นประดิษฐานอยู่ภายใน ผนังก่อด้วยอิฐ เจดีย์ชัยมงคลเป็นโบราณสถานที่ยังคงอยู่ในสมัยกรุงศรีอยุธยา ทรงระฆังคว่ำ ด้านในไม่กว้างมาก ตรงกลางเป็นหลุมลึก สภาพแวดล้อมภายในมีลักษณะคล้ายถ้ำ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียสูง (Maruekarajtinplaeng, 2017) มีผลงานวิจัยหลายเรื่องที่น่าสนใจพบ

ความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทจากถ้ำ และโบราณสถาน เช่น Nakaew, Pathom-aree, & Lumyong (2009) พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากตัวอย่างดินของวนอุทยานถ้ำผาเทพและถ้ำผานางคอย ที่ตั้งในภาคเหนือของประเทศไทย พบทั้งเชื้อแอคติโนมัยซีท rare actinomycetes และ very rare actinomycetes จำแนกชนิดพบว่าประกอบ genus *Micromonospora*, *Spirillospora*, *Catellatospora* และ *Nonomuraea* เชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการผลิตสารต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกและสารต้านมะเร็ง Yucel, & Yamac (2010) แยกแอคติโนมัยซีทจากกำแพงหิน พื้นผิวถ้ำและดินจากถ้ำ Karstic 19 แห่งประเทศตุรเคีย พบว่าร้อยละ 62 ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็น *Streptomyces* ที่สามารถสังเคราะห์สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ได้โดยเฉพาะ *Streptomyces* sp.1492 พบว่าเชื้อจะผลิตสารต้านการเจริญจุลินทรีย์สูงที่สุดเมื่อใช้เวลาเลี้ยงเชื้อ 5 วันเมื่อเลี้ยงในระบบ batch culture พบว่าสารเมแทบอลิต์ที่เชื้อนี้สร้างสามารถยับยั้งการเจริญของ methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistance *Enterobacter faecium* (VRE) และ *Acinetobacter baumannii* ได้ Rajput, Biswas, & Rai (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากถ้ำโคทัมซาร์ (Kotumsar) ประเทศอินเดีย พบเชื้อ *Streptomyces* ที่ผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ Cheeptham et al. (2013) ศึกษาความหลากหลายแบคทีเรียที่แยกจากถ้ำเฮล์มเคิน (Helmcken) ในอุทยานแห่งชาติ ประเทศโคลัมเบีย แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้มากกว่า 400 ไอโซเลต เมื่อจำแนกชนิดพบว่าร้อยละ

79.3 เป็นเชื้อ genus *Streptomyces* เชื้อที่แยกได้สร้างสารต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, และ *Candida albicans* และ Jiang et al. (2015) แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. จากดินถ้ำ Karst ประเทศจีน พบเชื้อ *Streptomyces* sp. CC8-201 ที่สามารถผลิตยา Xiakemycin A ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม Pyranonaphthoquinone (PNQ) ซึ่งสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาได้

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท จากพื้นผิวไบโอสถและเจดีย์ในวัดใหญ่ชัยมงคล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเพื่อเป็นองค์ความรู้ที่สามารถพัฒนาสู่การผลิตสารปฏิชีวนะได้ในลำดับต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

เก็บตัวอย่างคราบตะกอนจากพื้นผิวไบโอสถและเจดีย์ ในวัดใหญ่ชัยมงคล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (Maruekarajitinplaeng, 2017) ด้วยวิธีกวาดเชื้นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วดูตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจาง ตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) (Jeffrey, 2008) ทำการกระจายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน เลือกเก็บโคโลนีที่มี

ลักษณะของแอคติโนมัยซีท คือ จะเจริญโดยมีส่วนที่จมลงในเนื้ออาหารและเจริญเหนือผิวหน้าอาหาร ลักษณะผิวหน้าโคโลนีจะคล้ายผ้ากำมะหยี่ ไม่มันวาว นำเชื้อที่คัดแยกได้ไป re-streak บนอาหารสูตร Hickey Tresner's agar (HTA) (Abdulla, Eric, Magdi, & Ahmed, 2008) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งเยี่ยงสูตร HTA เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลท เพาะลงบนอาหาร HTA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกภาพพร้อมรายละเอียดการเจริญของเชื้อ (Maruekarajitinplaeng, 2017)

3. การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์

เพาะเชื้อแต่ละไอโซเลทลงบนอาหาร HTA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน (basal medium) ที่ประกอบด้วย beef extract ปริมาณ 3 กรัม peptone ปริมาณ 5 กรัม น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (160 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส (glucose) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ได้แก่ ฟรุคโตส (fructose) กาแลกโตส (galactose) แลคโตส (lactose) และแป้งมันสำปะหลัง (cassava

starch) และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ข้าวโพดบด (corn meal) ถั่วเหลืองบด (soybean meal) แอมโมเนียมไนเตรด (ammonium nitrate) โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) และยีสต์สกัด (yeast extract) เมื่อครบเวลา เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลอดเซนต์ปีฟาร์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลงจาก Bayram, 2021)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารเมแทบอลิต์จากแอคติโนมัยซีต

ดัดแปลงจาก Niyomvong (2021) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* TISTR 2372, *E. coli* TISTR 527, *K. pneumoniae* TISTR 1867, *P. aeruginosa* TISTR 2370 และ *S. aureus* TISTR 746 มา streak ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาวะเขย่า (160 รอบ/นาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยนำเซลล์แขวนลอย ใส่หลอดเซนต์ปีฟาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าเซลล์ให้ได้ OD=0.5 แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีปลอดเชื้อจุ่มเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

MHA จากนั้นใช้ปากคีบคีบ paper disc ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางบนอาหาร MHA จำนวน 6 แผ่น โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเชิงลบ และใช้สเตรปโตมัยซินเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอวงใสที่เกิดขึ้น พร้อมกับวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (ดัดแปลงจาก Al Farraj et al., 2019)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

เชื้อแอคติโนมัยซีต ทั้งหมด 32 ไอโซเลท ที่แยกจากตัวอย่างคราบตะกอนพื้นผิวโบสถ์และเจดีย์ ด้วยอาหาร SCA เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น บนอาหาร HTA แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ได้ผลดัง (Figure 1)

จาก (Figure 1) พบว่าลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีตภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ มีความหลากหลายทั้งด้านขนาด สีเส้นใยและสีสปอร์ ความสูงและผิวหน้าโคโลนี สามารถแบ่งกลุ่มตามสีของเส้นใยและสปอร์ ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สีขาว มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1IJ03, 2IB02, 2IB04 และ 2IJ04 กลุ่มที่ 2 สีครีม มี 8 ไอโซเลท คือ 1OB01, 1IJ01, 1IJ05, 1IJ06, 1IJ07, 1IJ08 1IJ10 และ 1IJ11 กลุ่มที่ 3 สีเหลือง มี 2 ไอโซเลท คือ 2IB03 และ 2OJ03 และกลุ่มที่ 4 สีนํ้าตาลถึงนํ้าตาลเข้ม มี 18 ไอโซเลท ได้แก่ 1OB02, 1IB01, 1IB02, 1IB03, 1OJ01, 1OJ02, 1OJ03, 1IJ02, 1IJ04, 1IJ09, 1IJ12, 2OB01, 2IB01, 2OJ01, 2OJ02, 2IJ01, 2IJ02 และ 2IJ03 และจากการสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงไอโซเลท 1IB01, 1IB02 และ 1OJ03

และ 2OJ03 เปลี่ยนจากสีเริ่มต้นคือสีขาวเป็นสีเหลือง ซึ่งเกิดจากไฮโซเลทดังกล่าวผลิตรสสีและหลังจากออกมาออกเซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาด้านความสามารถของเชื้อกลุ่มนี้ที่ผลิตรสเมแทบอลิต์ ซึ่งมีทั้งกลุ่มที่ผลิตรสเมแทบอลิต์ที่มีสีแล้วหลังจากออกมาออกเซลล์ (El-Naggar, & El-Ewasy, 2017; Bayram, 2021) และกลุ่มที่ผลิตรสเมแทบอลิต์ที่มีสีแล้วเก็บไว้ในเซลล์ (Kheiralla, Hewedy, Mohammed, & Darwesh, 2016) อย่างไรก็ตามพบว่า มี 2 ไฮโซเลท ที่มีลักษณะ colony morphology

ที่แตกต่างจากผลงานวิจัยที่ผ่านมา กล่าวคือโคโลนี จะมีลักษณะเป็นแอ่งกลางโคโลนี ได้แก่ ไฮโซเลท 2IB01 และ 2IB02

กลไกการผลิตสารเมแทบอลิต์ของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีท ขึ้นกับหลายปัจจัย (Budhathoki, & Shrestha, 2020) ดังนั้นเพื่อคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีท เบื้องต้นจึงนำเชื้อทั้ง 32 ไฮโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า (ความเร็ว 160 รอบ/นาที) เป็นเวลานาน 5 วัน ได้ผลดัง (Table 1)

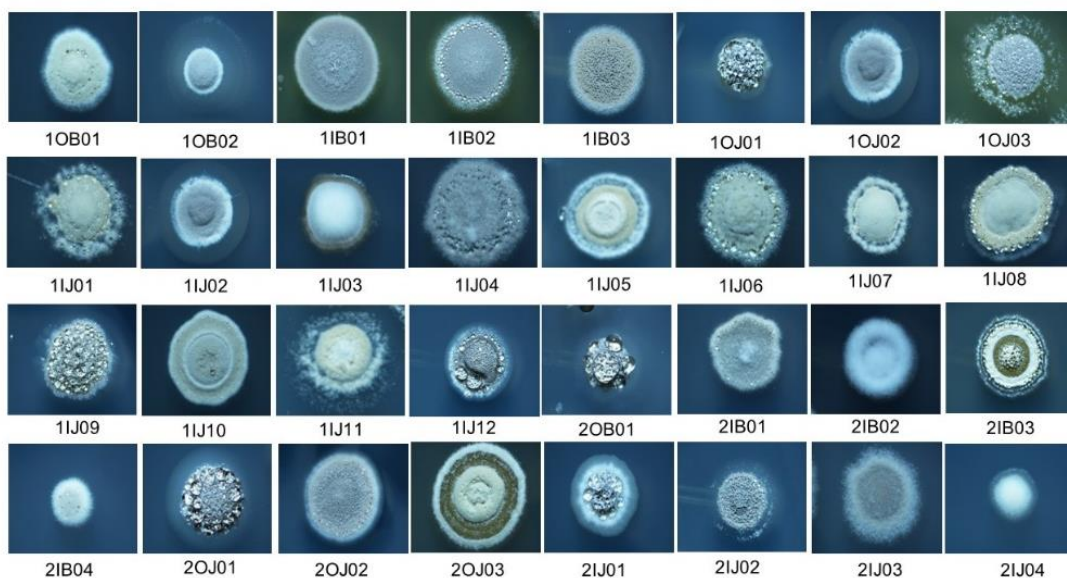


Figure 1 Colony morphology of actinomycetes grown on HTA incubated at 30°C for 7 days under stereo microscope.

Table 1 Pigment production of actinomycetes grown on basal broth medium which incubated at 30 degree caesious, 160 rpm for 5 days.

order	isolate	pigment	order	isolate	pigment
1	1OB01	yellow	17	1IJ09	N
2	1OB02	N	18	1IJ10	light brown
3	1IB01	N	19	1IJ11	light brown
4	1IB02	light brown	20	1IJ12	N
5	1IB03	brown	21	2OB1	yellow
6	1OJ01	N	22	2IB01	pink
7	1OJ02	N	23	2IB02	pink
8	1OJ03	N	24	2IB03	brown
9	1IJ01	light brown	25	2IB04	N
10	1IJ02	N	26	2OJ01	brown
11	1IJ03	N	27	2OJ02	N
12	1IJ04	violet	28	2OJ03	N
13	1IJ05	light brown	29	2IJ01	N
14	1IJ06	brown	30	2IJ02	yellow
15	1IJ07	light brown	31	2IJ03	pink
16	1IJ08	light brown	32	2IJ04	pink

Note: N = not produce pigment.

จาก (Table 1) พบว่ามีแอคติโนมัยซีทที่มีสามารถในการผลิตสารเมแทบอลิไต์ได้ แบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตสารเมแทบอลิไต์ที่ไม่มีสีและกลุ่มที่ผลิตสารเมแทบอลิไต์ที่มีสี ไอโซเลทที่ผลิตสารเมแทบอลิไต์ที่ไม่มีสีมีจำนวน 13 ไอโซเลท ส่วนไอโซเลทที่ผลิตสารเมแทบอลิไต์ที่มีสี มีจำนวน 19 ไอโซเลท โดยสารเมแทบอลิไต์ที่ผลิตมีหลายสี ได้แก่ ผลิตสีเหลือง มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1OB01, 2OB01 และ 2IJ02 ผลิตสีน้ำตาล (brown) มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1IB03, 1IJ06, 2IB03 และ 2OJ01 ผลิตสีน้ำตาลอ่อน (light brown) มี 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1IB02, 1IJ01, 1IJ05, 1IJ07, 1IJ08, 1IJ10 และ 1IJ11 ผลิตสีชมพู มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 2IB01, 2IB02, 2IJ03 และ 2IJ04 ในขณะที่มีเพียง

ไอโซเลทเดียวคือ 1IJ04 ผลิตสีม่วง การที่เชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ผลิตสารสีได้แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเป็นแอคติโนมัยซีทคนละสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากดินรอบรากพืชของ Kheiralla, Hewedy, Mohammed, & Darwesh (2016) ที่เพาะเชื้อในอาหารแข็งสูตรยีสต์มอลต์ (yeast malt agar) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้ง 12 ไอโซเลท ผลิตสารที่มีสีต่าง ๆ กัน คุณสมบัติของสารเมแทบอลิไต์ของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทนอกจากมีสีที่แตกต่างกันยังพบว่ามีความยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แตกต่างกันด้วย (Thompson, Fink, & Nguyen, 2002; Saba, Salehi, & Nima, 2016; Abraham, & Chauhan, 2018; Budhathoki, & Shrestha, 2020)

จากผลการคัดกรองเชื้อเบื้องต้นโดยใช้เกณฑ์ด้านความแตกต่างของการผลิตสารสีออกนอกเซลล์ จึงคัดเลือกไอโซเลต 11J04 ซึ่งผลิตสีม่วง ทั้งนี้เคยมีรายงานคุณสมบัติของสารสีม่วงจากเชื้อ *Streptomyces* ที่แยกจากดินในประเทศอินเดีย และพบว่าสารดังกล่าวสามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง รา ยีสต์ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งพบว่ามีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Manasa et al., 2012) เพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อสมบัติของสารเมแทบอลิต์ ผลการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง ไอโซเลต 11J04 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกาแลกโตส แลคโตส ฟรุคโตส และแป้งมันสำปะหลังทดแทนกลูโคสได้ผลดัง (Table 2)

จาก (Table 2) พบว่า ไอโซเลต 11J04 ผลิตสารเมแทบอลิต์ที่มีสีแตกต่างกัน เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อจะผลิตสารเมแทบอลิต์ออกนอกเซลล์เป็นสีม่วงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง

ในขณะที่เมื่อใช้น้ำตาลกาแลกโตส ฟรุคโตส และแลคโตส จะผลิตสารเมแทบอลิต์ออกนอกเซลล์แต่เป็นสารสีน้ำตาล ทั้งนี้พบว่าสารเมแทบอลิต์ที่ผลิตเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส กาแลกโตส ฟรุคโตส แลคโตส และแป้งมันสำปะหลัง มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 527, *K. pneumonia* TISTR 1867 และ *P. aeruginosa* TISTR 2370 ได้

นอกจากแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทแล้วงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแหล่งไนโตรเจนก็มีผลเช่นกัน (Al Farraj et al., 2020) ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง ไอโซเลต 11J04 ทดแทนน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตรพื้นฐาน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นถั่วเหลืองบด (soybean meal), ข้าวโพดบด (corn meal), ยีสต์สกัด (yeast extract), โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) และ แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate) ดัง (Table 3)

Table 2 The production of pigments and bioactive compounds from *Actinomycetes* isolate 11J04 culture in different carbon sources against some pathogenic bacteria.

carbon sources	pigment	inhibition zone of bacterial tests (diameter in mm.)				
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
		TISTR 2372	TISTR 527	TISTR 1867	TISTR 2370	TISTR 746
glucose	purple	15.0	inactive	inactive	inactive	14.0
galactose	brown	11.0	inactive	inactive	inactive	11.0
lactose	brown	12.0	inactive	inactive	inactive	10.0
fructose	brown	13.0	inactive	inactive	inactive	12.0
casava starch	purple	17.0	inactive	inactive	inactive	14.0

Table 3 The production of pigments and bioactive compounds from *Actinomycetes* isolate 1IJ04 culture in different nitrogen sources against some pathogenic bacteria.

nitrogen sources	pigment	inhibition zone of bacterial tests (diameter in mm.)				
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
		TISTR 2372	TISTR 527	TISTR 1867	TISTR 2370	TISTR 746
soybean meal	brown	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
corn meal	brownish	12	inactive	inactive	inactive	11
	violet					
yeast extract	grey	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
monosodium glutamate	violet	14	inactive	inactive	inactive	13
ammonium nitrate	brown	12	inactive	inactive	inactive	13

จาก (Table 3) พบว่า ไอโซเลท 1IJ04 ผลิตสารเมแทบอลิไต์ที่มีสีแตกต่างกัน เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อจะผลิตสารเมแทบอลิไต์ออกนอกเซลล์ได้สีต่าง ๆ กัน ได้แก่ สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมม่วง สีเทา สีม่วง และสีน้ำตาล เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจน ถั่วเหลืองบด ข้าวโพดบด ยีสต์สกัด โมโนโซเดียมกลูตาเมต และแอมโมเนียมไนเตรท ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าสารเมแทบอลิไต์จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 เฉพาะเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นข้าวโพดบด โมโนโซเดียมกลูตาเมต และแอมโมเนียมไนเตรทเท่านั้น ในขณะที่สารเมแทบอลิไต์ที่ได้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นถั่วเหลืองบด และยีสต์สกัด จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้ และจาก (Table 2) และ (Table 3) พบว่า สารเมแทบอลิไต์ที่ได้ไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นกลูโคส กาแลกโตส ฟรุคโตส และแลคโตส แป้งมันสำปะหลัง ถั่วเหลืองบด ข้าวโพดบด ยีสต์สกัด โมโนโซเดียม-

กลูตาเมต และแอมโมเนียมไนเตรท พบว่าสารเมแทบอลิไต์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 527, *K. pneumoniae* TISTR 1867 และ *P. aeruginosa* TISTR 2370 ได้ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งแตกต่างจากคุณสมบัติของสารสีจากเชื้อ *Streptomyces torulosus* (Kheiralla, Hewedy, Mohammed, & Darwesh, 2016) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแกรมบวก *B. cereus* และ *S. aureus* และแกรมลบ คือ *E. coli* และ *s. typhi* ได้ สาเหตุที่สารเมแทบอลิไต์จากไอโซเลท 1IJ04 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบกลุ่มที่เป็นแกรมลบได้อาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งนอกจากจะมีชั้นเพปติโดไกลแคนแล้ว ยังมีลิพิดโพรตีน ลิพิดพอลิแซ็กคาไรด์รวมทั้งมีกรดอะมิโน ชนิดไดอะมิโน-พิมิลิก รวมทั้งลักษณะโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียแกรมลบเป็นเมมเบรนแบบ 2 ชั้น คือ

เมมเบรนชั้นนอกและเมมเบรนชั้นใน โดยเมมเบรนชั้นนอก มีชั้นไขมันเป็นองค์ประกอบถึง ร้อยละ 11-22 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ และทำหน้าที่กั้นสารแปลกปลอมที่จะเข้ามาทำลายเซลล์จากภายนอกได้อีกทั้ง *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่สร้างแคปซูลได้ ซึ่งแคปซูลเป็นโครงสร้างที่ทำให้เซลล์มีความทนทานต่อสารแปลกปลอมหรือสภาวะกดดันต่าง ๆ ได้ดี (Madigan, & Martinko, 2006) จากผลการทดลองข้างต้น นับว่าเป็นประเด็นที่ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของสารเมแทบอลิต์ที่ไอโซเลท 11J04 ผลิตนั้นมีการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 ได้อย่างไร ทั้งนี้การที่สารเมแทบอลิต์ที่ได้จากไอโซเลท 11J04 สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก นับว่าเป็นข้อดีที่ตรงกับคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะชนิด narrow spectrum ซึ่งทำให้ง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานในอนาคต รวมทั้งสารเมแทบอลิต์จากไอโซเลท 11J04 เป็นสารที่เชื้อไอโซเลทนี้ผลิตแล้วหลั่งออกนอกเซลล์การที่จะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ สามารถนำไปใช้ได้โดยไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการสกัดสารออกจากเซลล์ ซึ่งจะเป็นการลดขั้นตอนลดระยะเวลา และลดต้นทุนลงได้อีกช่องทางหนึ่งด้วย

จากศักยภาพเบื้องต้นด้านความสามารถในการผลิตและคุณสมบัติการออกฤทธิ์ด้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกของสารเมแทบอลิต์ที่แอคติโนมัยซีทไอโซเลท 11J04 ผลิต นับว่าเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจอย่างยิ่งด้านการศึกษาด้อยอดในอนาคตในการระบุสายพันธุ์ และการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท 11J04 ผลิตสารต้านจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและความสามารถในการผลิต

สารสี โดยปรับมาใช้แบ่งหรือแหล่งโปรตีนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ ที่มีราคาถูก ทดแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาแพงในการผลิตสารเมแทบอลิต์เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและยังสามารถช่วยส่งเสริมการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติสืบต่อไป

สรุป

คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากพื้นผิวโบสถ์และเจดีย์ วัดใหญ่ชัยมงคล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 32 ไอโซเลท พบเชื้อที่ผลิตและหลั่งสารสีออกนอกเซลล์จำนวน 19 ไอโซเลท คัดเลือก 11J04 ซึ่งผลิตสารสีม่วง เป็นเชื้อตัวแทน ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมการด้านการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรค พบว่า แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตสารด้านการเจริญ *B. cereus* TISTR 2372 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 17 มิลลิเมตร และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ในการผลิตสารด้านการเจริญ *B. cereus* TISTR 2372 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 14 มิลลิเมตร นับว่าสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากไอโซเลท 11J04 มีศักยภาพสูงที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตสารด้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้

เอกสารอ้างอิง

- Abdulla, H., Eric, M., Magdi, B., & Ahmed, D. (2008). Characterization of Actinomycetes isolation from ancient stone and their potential for deterioration. *Polish Journal of Microbiology*, 57(3), 213-220.

- Abraham, J., & Chauhan, R. (2018). Profiling of red pigment produced by *Streptomyces* sp. JAR6 and its bioactivity. *3 Biotech*, 8(1), 22.
- Al Farraj, D. A., Rakesh, V. B., Csaba, V. B., Mohamed, S. E., Alokda, A. M., & Mahmoud, A. H. (2019). Antibiotics production in optimized culture condition using low-cost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment. *Science Journal of King Saud University*, 32, 1528-1535.
- Al Farraj, D. A., Varghese, R., Vagvolgyi, C., Elshikh, M. S., Alokda, A. M., & Mohmoud, A. H. (2020). Antibiotic production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment. *Journal of King Saud University-Science*, 32(2), (1528-1535).
- Azimi, S., Baserisalehi, M., & Bahador, N. (2014). Evaluation of antimicrobial pigment produced by *Streptomyces coeruleorubidus*. *Nature Environment and Pollution Technology*, 13(3), 641-644.
- Azimi, S., Salehi, M. B., & Bahador, N. (2016). Isolation and identification of *Streptomyces ramulosus* from soil and determination of antimicrobial property of its pigment. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1(1), 36-41.
- Bayram, S. (2021). Production, purification, and characterization of *Streptomyces* sp. strain MPPS2 extracellular pyomelanin pigment. *Archives of Microbiology*, 203, 4419-4426.
- Budhathoki, S., & Shrestha, A. (2020). Screening of Actinomycetes from soil for antibacterial activity. *Nepal Journal of Biotechnology*, 8(3), 102-110.
- Cheeptham, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L. C., Azad, N., Donkor, K. K., & Home, D. (2013). Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 42(1), 35-47.
- El-Naggar, N. A., & El-Ewasy, S. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7, 42129.
- Indrawattana, N., & Vanaporn, M. (2015). Nosocomial infection. *Journal of Medicine and Health Sciences*, 22(1), 81-92. (in Thai)
- Jeffrey, L. H. (2008). Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soil at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3697-3702.
- Jiang, Z., Guo, L., Chen, C., Liu, S., Zhang, L., Dai, S., He, Q., You, X., Hu, X., Tuo, L., Jiang, W., & Sun, C. (2015). Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. *The Journal of Antibiotics*, 68, 771-994.
- Kheiralla, Z. H., Hewedy, M. A., Mohammed, H. R., & Darwesh, O. M. (2016). Isolation of pigment producing Actinomycetes from rhizosphere soil and application It in textiles dyeing. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(5), 2128- 2136.
- Madigan, M., & Martinko, J. (2006). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). New York: Pearson Global Edition.

- Manasa, M., Poornima, G., Abhipsa, V., Rekha, C., PrashithKekuda, T. R., Onkarappa, R., & Mukunda, S. (2012). Antimicrobial and antioxidant potential of *Streptomyces* sp RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 1(3), 39-44.
- Maruekarajinplaeng, S. (2017). Isolation and study in some character of actinobacteria from archaeological site in Kamphaeng Phet Historical Park with affect biodeterioration. *Srinakharinwirot Science Journal*, 33(2), 51-69. (in Thai)
- Niyomvong, N. (2021). Broad-spectrum antimicrobial compound from *Streptomyces coeruleus* NN91. *Journal of Agriculture*, 37(3), 305-351. (in Thai)
- Nakaew, N., Pathom-aree, W., & Lumyong, S. (2009). Genetic diversity of rare Actinomycetes from Thai cave and their possible use as new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 23(2), 21-26.
- Rajput, Y., Biswas, J., & Rai, V. (2012). Potentiality test in antimicrobial activity and antibiotic sensibility of subterranean *Streptomyces* strains isolates from Kotumsar cave of India. *International journal of Biological Chemistry*, 6(2), 53-60.
- Ray, B. (2003). *Fundamental food microbiology* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Saba, A., Salehi, M. B., & Nima, B. (2016). Isolation and identification of *Streptomyces ramulosus* from soil and determination of antimicrobial property of its pigment. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1(6), 36-41.
- Thompson, C. J., Fink, D., & Nguyen, L. D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology*, 3(7), reviews1020.1–reviews1020.4.
- Watanadilok, R., Nareeboon, P., & Taweedes, S. (2015). *Discovery of bioactive pigments from marine microorganisms* (research report). Pathumthani: Faculty of Science, Rangsit University. (in Thai)
- Wang, L., Lei, J., Xiang, W., Jiang, S., & Yang, Z. (2009). Identification and characterization of purple pigment-producing actinomycetes strain. *China Journal Apply Environment Biotechnology*, 15(1), 139-142.
- Yucel, S., & Yamac, M. (2010). Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish Karstic cave against antibiotic resistant microorganisms. *Pak Journal Pharmaceutical Science*, 23(1), 1-6.