

ORIGINAL BREVE

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Streptomyces* sp. 6E3 AISLADO DE CONCENTRADO DE MINERAL*Angela Ampuero ^{1,a}, Rosario Rojas ^{2,b}, Candy Ruiz ^{2,c}, Jasmin Hurtado ^{1,d}¹ Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.² Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.^a Químico farmacéutico; ^b médico cirujano, PhD en Química Médica y Farmacognosia; ^c químico, magister en Química; ^d microbiólogo, doctor en Ciencias.* El presente estudio forma parte de la tesis: Ampuero A. Evaluación de actividad antibacteriana de *Streptomyces* sp. 6E3 aislado de minerales frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. [Tesis de Licenciatura]. Lima: Facultad de Ciencia y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de un cultivo de *Streptomyces* sp. 6E3 aislado de minerales frente a diferentes cepas patógenas, producir un extracto y estimar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). La cepa *Streptomyces* sp. 6E3 mostró actividad antimicrobiana principalmente contra *Staphylococcus aureus* (S. aureus). Cinco de las seis fracciones presentaron actividad antimicrobiana y la más efectiva dio una CMI de 0,88 ug/mL frente a S. aureus ATCC 33862, 0,44 ug/mL frente a S. aureus ATCC 43300 y 1,76 ug/mL frente a S. aureus cepa SARM. *Streptomyces* sp. 6E3 tiene un potencial antimicrobiano frente a cepas de S. aureus resistentes a meticilina y no resistentes, siendo de interés la realización de más estudios sobre sus metabolitos activos.

Palabras clave: *Streptomyces*; Minerales; Agentes Antiinfecciosos; Extractos Celulares; Bacteria; *Staphylococcus aureus*; Productos Biológicos; Pruebas de Sensibilidad Microbiana (fuente: DECS BIREME).

***Streptomyces* sp. 6E3 ANTIMICROBIAL ACTIVITY ISOLATED FROM MINERAL CONCENTRATE**

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the antimicrobial activity of a culture of *Streptomyces* sp. 6E3 isolated from minerals against different pathogenic strains, to produce an extract and to estimate the minimum inhibitory concentration (MIC) of the fractions against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Streptomyces* sp. 6E3 showed antimicrobial activity primarily against *Staphylococcus aureus* (S. aureus). Five of the six fractions presented antimicrobial activity and the most effective gave a MIC of 0.88 ug / mL against S. aureus ATCC 33862, 0.44 ug / mL against S. aureus ATCC 43300 and 1.76 ug / mL vs. a S. aureus MRSA strain. *Streptomyces* sp. 6E3 has an antimicrobial potential against S. aureus strains resistant to methicillin and non-resistant, being of interest carrying out of more studies on its active metabolites.

Keywords: *Streptomyces*; Minerals, Anti-infective agents; Cell extracts; Bacteria; *Staphylococcus aureus*; Biological Products; Microbial Sensibility Tests (Source: MeSH NLM).

Citar como: Ampuero A, Rojas R, Ruiz C, Hurtado J. Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. 6E3 aislado de concentrado de mineral. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2020;37(1):110-4. Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4505>

Correspondencia: Jasmin Hurtado; Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres. Lima, Perú; jasmin.hurtado@upch.pe

Recibido: 30/04/2019
Aprobado: 29/01/2020
En línea: 19/03/2020

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es una de las más importantes amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo de los países. Actualmente se están desarrollando diferentes alternativas para combatir a las cepas microbianas que presentan multiresistencia y una de ellas consiste en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con bioactividad antimicrobiana.

Dentro de los microorganismos productores de compuestos bioactivos, los *Streptomyces* son el género más importante de bacterias que producen compuestos bioactivos como policétidos, péptidos e híbridos de policétidos-péptidos que han sido caracterizados con diferentes actividades biológicas como antibacterianas, antifúngicas y anticancerosas ⁽¹⁾.

Aproximadamente el 60% de todos los antibióticos conocidos contra bacterias grampositivas y gramnegativas han sido aislados de *Streptomyces*, entre ellos tetraciclina, daptomicina y cloranfenicol ⁽²⁾. En los últimos años y con el fin de encontrar nuevos metabolitos con actividad antimicrobiana a partir de estos microorganismos, se ha empezado a realizar el aislamiento de estas bacterias a partir de ambientes poco explorados como el mar, las plantas ^(3,4) e inclusive los minerales ⁽⁵⁾.

En Perú se han encontrado especies, en ambientes marinos, con actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina ⁽⁶⁾ y una cepa capaz de actuar frente a cepas patógenas resistentes a betalactámicos ⁽⁷⁾.

El objetivo de este estudio es determinar la actividad antimicrobiana de cultivos y extractos metabólicos de *Streptomyces* sp. 6E3 frente a diferentes enterobacterias patógenas, *Staphylococcus aureus* y *Candida* sp.

EL ESTUDIO

Este estudio es de tipo experimental en el que se analizó la actividad antimicrobiana de la cepa de *Streptomyces* sp. 6E3, la cual fue aislada a partir de minerales y previamente identificada, fenotípica y genéticamente ⁽⁵⁾. Las cepas a las que fue enfrentada *Streptomyces* sp. 6E3 fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Salmonella typhimurium* ATCC 25241, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (SARM) y *Staphylococcus aureus* (SARM) de origen clínico, provenientes del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt, de Lima.

La fase de producción se determinó por medio de la prueba de actividad antimicrobiana, en la cual se usó el método de doble capa de Singh *et al.* ⁽⁸⁾ Se enfrentaron cultivos de *Streptomyces* sp. 6E3 sembrados en agar XGAL en el centro de la placa de 3, 5, 7 y 10 días de crecimiento a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 33862. En estas etapas de crecimiento también se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas del crecimiento de la colonia.

Para el cribado de la actividad antimicrobiana de la cepa, se utilizó el método de doble capa de Singh *et al.* ⁽⁸⁾ El experimento fue llevado a cabo por duplicado frente a cada cepa patógena. Para los extractos y las fracciones, se empleó el método de difusión en agar, modificado por Rojas *et al.* ⁽⁹⁾

Para la preparación de los extractos se utilizó el solvente acetato de etilo. Se sembraron 30 placas de XGAL y, con ayuda de una micropipeta, se añadió al cultivo 3 mL del solvente. Se procedió al barrido de las células humedecidas por el solvente y el sobrenadante, los que se colectaron en tubos

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio: La creciente resistencia microbiana a los antibióticos debido al uso indiscriminado de estos, requiere el desarrollo de nuevas alternativas, como el uso de microorganismos aislados de ambientes poco estudiados.

Principales hallazgos: Se ha podido identificar una cepa de *Streptomyces* 6E3 aislada de minerales con capacidad de inhibir *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Implicancias: La obtención de microorganismos que podrían convertirse en una alternativa de tratamiento, ayudaría a resolver el problema de salud pública que estamos enfrentando.

Falcon. Se homogenizó el contenido de los tubos y se agitó con ayuda de ultrasonido por 15 minutos a temperatura ambiente. Los tubos con las células lisadas fueron centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm. Luego se retiró el sobrenadante y se procedió a evaporar el solvente acetato de etilo, primero en un rotavapor con una presión menor a 250 milibar y en baño maría a 40 °C y luego con una corriente de gas nitrógeno hasta obtener 147 mg de extracto, el cual fue mantenido a -20 °C hasta su uso.

A este extracto se le realizó una cromatografía de capa fina de fase reversa (TLC Silicagel 60 RP18 de Merck®) con una fase móvil de acetonitrilo:agua en proporción de 2:1 para observar el número de compuestos bajo una lámpara UV a 254 nm y 366 nm. Además, se realizó un antibiograma por el método de difusión con discos para observar si aún se tenía el efecto antimicrobiano deseado.

Para el fraccionamiento del extracto, se utilizó una columna de vidrio empacada con gel de sílice RP60 de Merck®, lavada previamente con metanol. Se disolvieron 50 mg del extracto en 400 uL de acetato de etilo. Las fases móviles fueron 20 mL de acetonitrilo y agua en proporciones de 1:1 (v/v), 1:2, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 y 10:0. Se recolectaron las fracciones en tubos de ensayo hasta un volumen de 4 mL y se les realizó una cromatografía de capa fina de fase reversa, usando una fase móvil de acetonitrilo:agua, en proporción 3:1.

Las cromatografías fueron observadas bajo luz UV de 366 nm. Se reunieron las fracciones que presentaron perfiles cromatográficos similares y se procedió a eliminar el solvente por medio del rotaevaporador. Se obtuvieron al final seis fracciones denominadas A, B, C, D, E y F, a las cuales se les realizó nuevamente una cromatografía de capa fina y un antibiograma según el método de difusión con discos para observar cuál de las fracciones tiene el efecto antimicrobiano.

Se utilizó el método de Wiegand *et al.* ⁽¹⁰⁾ para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Como con-

trol positivo, se usó vancomicina para las cepas de SARM y penicilina para *Staphylococcus aureus*, las cuales iban en un rango de 120 a 0,06 ug/mL. El control negativo fue un caldo Mueller Hinton inoculado con cepa patrón, el blanco fue un caldo estéril. Se disolvieron las seis fracciones en 400 uL de dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones *stock* y luego realizar las diluciones respectivas. Las cantidades usadas de las fracciones para hacer las soluciones madre fueron los siguientes: 0,5 mg de la fracción B; 0,5 mg de la fracción C; 0,5 mg de la fracción D; 2 mg de la fracción E, y 1 mg de la fracción F.

La microplaca fue incubada a 37 °C por 24 horas. Los resultados se obtuvieron por medio de dos métodos: a) se utilizó cloruro de trifeniltetrazolio, con el cual el viraje de la coloración del contenido de los pozos a rojo indicó crecimiento microbiano, y b) la microplaca fue puesta en una lectora de ELISA, en la cual solo se midió la turbidez. La CMI fue encontrada por medio de curvas de absorbancia versus concentración, según la metodología de Devienne *et al.* ⁽¹¹⁾

Se realizó el análisis estadístico descriptivo para analizar los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana por el método de doble capa y de difusión con discos.

HALLAZGOS

Se observó que la actividad antimicrobiana se dio en los cultivos de 7 y 10 días, lo cual se relacionó con la observación macroscópica de una sustancia rojiza en la colonia, mientras que microscópicamente se advirtieron esporas, lo cual indicó el fin de su fase micelial (Figura 1).

En el cribado con las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (SARM) y *Staphylo-*

coccus aureus cepa clínica (SARM), se observaron la presencia de halos de inhibición de 21,5 mm a 42 mm de diámetro. Con todas las otras cepas se encontraron halos de inhibición de 1,5 mm a 3 mm, razón por la cual se prosiguió con las tres cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se obtuvieron 141,9 mg de extracto, de los cuales se obtuvieron seis fracciones denominadas A, B, C, D, E y F y se pudieron identificar seis manchas cromatográficas numeradas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. La cromatografía de capa fina realizada a las fracciones corroboró la presencia de las mismas manchas cromatográficas presentes en el extracto bruto (Figura 2).

Se determinó la actividad antibacteriana de las fracciones, observándose halos de inhibición de 8 a 15 mm frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. La fracción D fue la que presentó la mejor actividad, así como una CMI más baja a diferencia del resto de las fracciones (Tabla 1 y figura 3). La fracción A no mostró ninguna actividad con el método de difusión con disco, razón por la cual no se determinó la CMI.

DISCUSIÓN

Los compuestos bioactivos son mayormente producidos como metabolitos secundarios y algunos de ellos pueden también pueden ser pigmentos ⁽¹²⁾. Muchos *Streptomyces* producen compuestos pigmentados con actividad antimicrobiana, como los antibióticos actinorrodina ⁽¹³⁾ y roseoflavina ⁽¹⁴⁾. La coloración rojiza observada en los cultivos de siete días podría estar relacionada con la producción de algún compuesto antimicrobiano producido por esta bacteria.

La cepa de *Streptomyces* utilizada en esta investigación, es de origen mineral, específicamente de un concentrado de

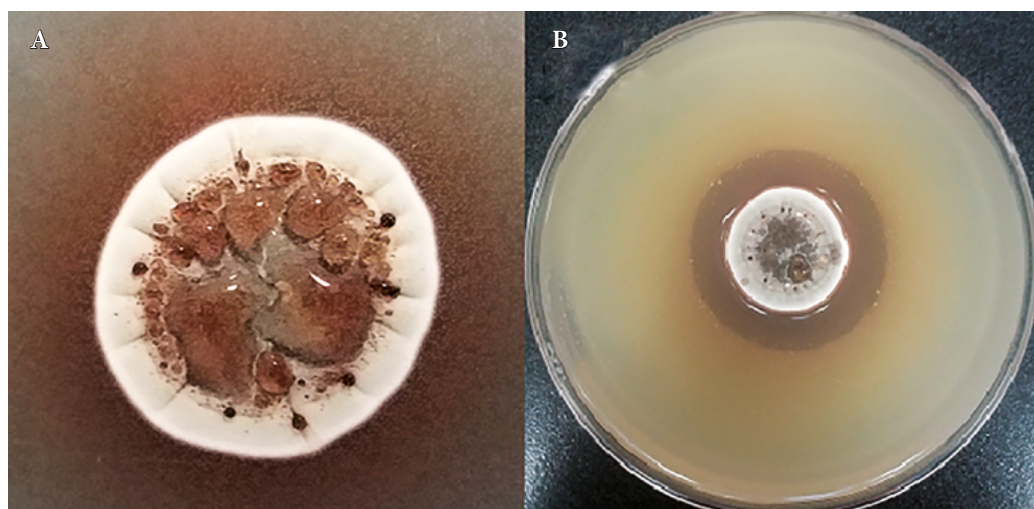
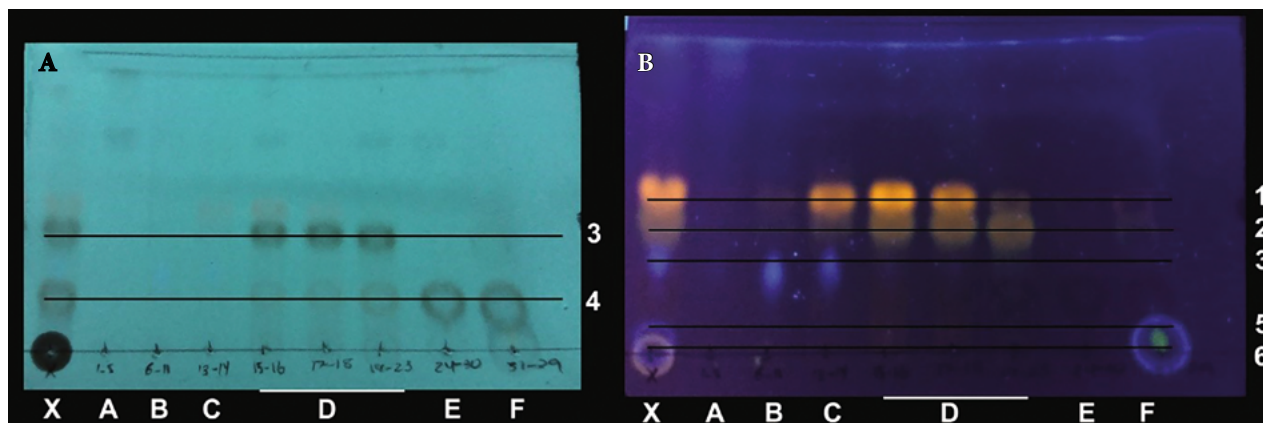


Figura 1. Determinación de la fase de producción. Observación macroscópica de la colonia de *Streptomyces* sp. 6E3 a los siete días (A). Actividad antimicrobiana de la cepa frente *Staphylococcus aureus* a los siete días (B)



1-6: manchas cromatográficas; A-F: fracciones; X: extracto bruto

Figura 2. Cromatografía de capa fina de las seis fracciones observadas bajo lámpara UV a 254 nm (A) y a 366 nm (B)

arsenopirita⁽⁵⁾. Esto demuestra que los ambientes mineros son de mucha importancia para la búsqueda de cepas con potencial bioactividad, lo mismo ha sido demostrado en un estudio, en el cual *Pleurostomophora* sp. aislado de minerales produjo compuestos antiinflamatorios⁽¹⁵⁾.

Empleando el método de doble capa (Tabla 1) se vio que la cepa de *Streptomyces*, aunque mostró inhibir el crecimiento de las cepas gramnegativas, la mayor actividad la obtuvo frente al grupo de grampositivas que estuvo representado por las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, dentro de las que se incluyen a las resistentes a meticilina. Se han aislado *Streptomyces* de ambientes poco estudiados, como el marino, aislándose la cepa RT-408 productor de un policétido⁽¹⁶⁾ y *Streptomyces* asociados a un coral⁽¹⁷⁾ que inhibe a cepas grampositivas, entre ellas SARM.

El proceso de extracción fue realizado a partir del barrido de la superficie de la placa de cultivo, y es posible que este

método, haya permitido recuperar los metabolitos liberados por las bacterias al medio o presentes en las células.

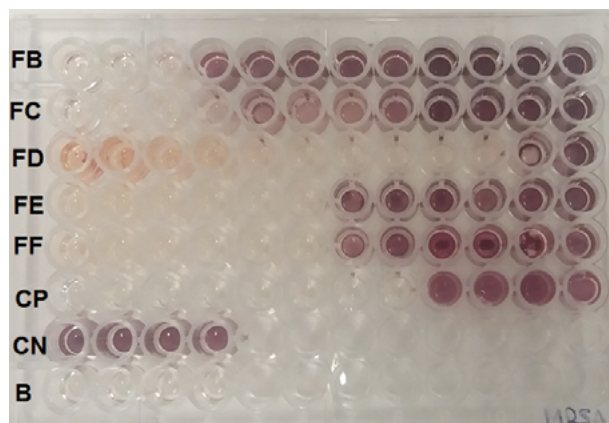
Para el caso de esta cepa, por medio de la cromatografía de capa fina se han visualizado al menos seis manchas cromatográficas (Figura 2). Muchas de las especies del género *Streptomyces* producen más de un metabolito dependiendo del extracto obtenido, el cual está en relación con el solvente usado y de la capacidad de arrastre según su polaridad y la de los compuestos^(18,19). De los metabolitos encontrados, solo algunos tendrían actividad antimicrobiana. En *Streptomyces coelicolor*, además de producir la actinorrodina también produce otros compuestos relaciones con actividad antimicrobiana⁽¹³⁾ y en *Streptomyces violaceusniger* se produce un antibacteriano y un antifúngico⁽²⁰⁾.

Los resultados obtenidos de la prueba de CMI de las fracciones muestran que la fracción D es la de mayor actividad. Se han separado dos manchas cromatográficas en esta fracción en mayor con-

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto de *Streptomyces* sp. 6E3 frente a cepas de *Staphylococcus aureus* por medio del método de difusión con discos y de microdilución

Fracciones	Método de difusión con discos			Método de microdilución		
	Diámetro de halos de inhibición (mm)			CMI (ug/mL)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (SARM)	<i>S. aureus</i> cepa clínica (SARM)	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (SARM)	<i>S. aureus</i> cepa clínica (SARM)
Fracción A	0	0	0	ND	ND	ND
Fracción B	13	13	12	8,13	8,13	16,3
Fracción C	10	14	13	8,13	8,13	16,3
Fracción D	14	11	11	0,88	0,44	1,76
Fracción E	8	10	9	2,19	2,19	4,38
Fracción F	0	15	13	8,75	2,19	8,75
Vancomicina ^a	ND	ND	ND	ND	0,12	0,47
Penicilina ^b	ND	ND	ND	0,06	ND	ND

ND: no determinado; CMI: concentración mínima inhibitoria
^a Se utilizó como control positivo para las cepas *S. aureus* resistente a meticilina
^b Se utilizó como control positivo para la cepa de *S. aureus* ATCC 33862



FB-FF: fracciones; CP: control positivo (vancomicina); CN: control negativo (caldo Mueller Hinton inoculado); B: blanco (caldo Mueller Hinton estéril)

Figura 3. Concentración mínima inhibitoria de las cinco fracciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (SARM)

centración, esto indicaría una mayor concentración de metabolitos activos con actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se ha reportado que el extracto de *Streptomyces* sp. ERI-3 produce inhibición de *Staphylococcus aureus* con una CMI de 0,25 mg/mL⁽¹⁹⁾, el compuesto 2 aislado de *Streptomyces* sp.

SPG278 tiene una CMI de 256 ug/mL contra *Staphylococcus aureus* (N6) y el extracto de *Streptomyces* M10-77 de origen marino tiene una CMI de 7,9 ug/mL⁽⁶⁾; mientras que, la fracción D de *Streptomyces* sp. 6E3 produjo una CMI de 0,44 ug/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (SARM).

Entre las limitaciones del estudio se considera el número de repeticiones de las pruebas. Además, no se pudo determinar si la actividad antimicrobiana del extracto estaba en un compuesto dentro de la célula o era excretado. Asimismo, como en cada fracción del extracto pueden estar presentes varios metabolitos secundarios, faltaría determinar si la inhibición se debió a la acción combinada de estos metabolitos o solo por uno de ellos.

En conclusión, la cepa *Streptomyces* sp. 6E3 presentó una mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 y a las cepas SARM.

Contribución de los autores: JH, AA, CR y RR han participado en la concepción del trabajo experimental, diseño del artículo, así como en su análisis, interpretación de datos y redacción. Además, AA ejecutó el trabajo experimental y recolectó datos, y CR apoyó en la ejecución. Todos los autores aprobaron la versión final del artículo.

Financiamiento: Por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) bajo el contrato 235-FincyT-IA-2013.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sottorff I, Wiese J, Lipfert M, Preußke N, Sönnichsen FD, Imhoff JF. Different secondary metabolite profiles of phylogenetically almost identical *Streptomyces griseus* strains originating from geographically remote locations. *Microorganisms*. 2019;7(6). pii: E166.
- Klementz D, Döring K, Lucas X, Telukunta KK, Erxleben A, Deubel D, et al. StreptomeDB 2.0—an extended resource of natural products produced by streptomycetes. *Nucleic Acids Res*. 2015;44(D1):D509-D14.
- Liang L, Haldi BA, Kerr RG. Draft Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain, an Antibiotic Producer Isolated from Marine Sediment in Prince Edward Island, Canada. *Microbiol Resour Announc*. 2019;8(35):e00870-19.
- Qi D, Zou L, Zhou D, Chen Y, Gao Z, Feng R, et al. Taxonomy and Broad-Spectrum Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 Isolated From Rhizosphere Soil of *Opuntia stricta*. *Front Microbiol*. 2019;10:1390.
- Hurtado J, Pacheco SL, Sheen P, Ugarte D. Actinobacteria isolated from Mineral Ores in Peru. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2019;2019:366-70.
- León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra D, Ayala N, Tomás G, et al. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(2):237-46.
- Navarro ML, León J, Huamán M, De Amat C, Morales M, Flores L, et al. Identificación de un Complejo Antimicrobiano Natural, producido por *Streptomyces californicus* 13A2 inhibidor de Bacterias B-Lactámicos Resistentes de Origen Hospitalario aisladas del Instituto Nacional Materno Perinatal de Lima, Perú. *Vitae*. 2014;21:S59.
- Singh LS, Baruah I, Bora T. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*. 2006;5(2):217-21.
- Rojas JJ, García AM, López AJ. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Bol latinoam Caribe plantas med aromát*. 2005;4(2):28-32.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
- Devienne KF, Raddi MSG. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Braz J Microbiol*. 2002;33(2):166-8.
- Rao MPN, Xiao M, Li W-J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front Microbiol*. 2017;8(1113).
- Nodwell JR. Microbe Profile: *Streptomyces coelicolor*: a burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiology*. 2019;165(9):953-5.
- Otani S, Takatsu M, Nakano M, Kasai S, Miura R. Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1974;27(1):88-9.
- Stierle AA, Stierle DB, Girtsman T, Mou T, Antczak C, Djaballah H. Azaphilones from an Acid Mine Extremophile Strain of a *Pleurostomophora* sp. *J Nat Prod*. 2015;78(12):2917-23.
- Sujatha P, Raju KVVSNB, Ramana T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*. 2005;160(2):119-26.
- Ubillus JA, Quispe JL, Durán RR, Trujillo SM, Salazar LL. Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogrius* M10-77 de origen marino. *RSVM*. 2015;35(1):13-9.
- Ilic S, Konstantinovic S, Todorovic Z, Lazic M, Veljkovic V, Jokovic N, et al. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Mikrobiologija*. 2007;76(4):480-7.
- Arasu MV, Duraipandiyar V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J Mycol Med*. 2009;19(1):22-8.
- Tripathi C, Praveen V, Singh V, Bihari V. Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Med Chem Res*. 2004;13(8-9):790-9.