

กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียที่แยก
จากรากพืชป่าชายเลน

**Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria Isolated from
Root of Mangrove Plants**

รัชณี มิ่งมา,^{1*} อารีย์ อินทร์นวล,¹ ทิพยดาพร เฟื่องรุ่ง,¹ ณัฐมณ บุญสัย²
และ กรรณิการ์ ดวงมลาย³

**Ratchanee Mingma,^{1*} Aree Innun,¹ Tipyadapron Pengrung,¹ Nathamon Boonsai²
and Kannika Duangmal³**

Received 16 November 2022, Revised 17 February 2023, Accepted 28 February 2023

ABSTRACT

Nowadays, pathogenic microorganisms tend to become increasingly resistant to antibiotics. Therefore, it is necessary to find new bioactive compounds. Actinobacteria are Gram-positive bacteria that can produce secondary metabolite with diverse biological activities. This study was carried out to evaluate the antagonistic activity of actinobacteria isolated from mangrove plants against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Total of 18 endophytic actinobacteria were isolated from roots of 7 different mangrove plant species, consisting of *Avicennia marina* (2 isolates), *Lummitzera littorea* (4 isolates), *Nypa fruticans* (1 isolate), *Rhizophora apiculata* (3 isolates), *Rhizophora mucronata* (5 isolates), *Sonneratia ovata* (1 isolate) and *Xylocarpus granatum* (2 isolates). The antimicrobial activity of isolated actinobacteria against tested bacteria was performed using agar overlay method. The results showed that 8 isolates could inhibit at least one type of tested pathogenic bacteria. Isolates RA02, RA05 and X03 that exhibited potent antagonistic activity were tested for antimicrobial activity using the agar well diffusion assay. The cell-free supernatant of isolate X03 displayed effective antagonistic activity against *B. cereus* and *S. aureus* with inhibition zone diameter of 18.5 and 20.0 mm., respectively. Based on partial 16S rDNA analysis, the isolate X03 was identified to the genus *Actinomadura* sp., with 98.93 % similarity to *A. atramentaria* IFO 14695^T (U49000). This study is the first published report of endophytic *Actinomadura* isolated from *Xylocarpus granatum* in

^{1*} โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus.,
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² โรงเรียนสาริตแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน

โดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Kasetsart University Laboratory School Kamphaeng Saen Campus, Science Classrooms in University-Affiliated School Project,
Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author: Tel. 08-6959-9594, E-mail address: faasnm@ku.ac.th

Thailand. These results reveal the mangrove plants are an important source for the discovery of actinobacteria with biologically active compound.

Keywords: Endophytic actinobacteria, Antimicrobial activity, Mangrove plant

บทคัดย่อ

ปัจจุบันจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถผลิตสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการการค้นหายูนิโคคัลของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากพืชป่าชายเลนต่อการยับยั้ง *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* แยกแอคติโนแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 18 ไอโซเลต จากรากพืชป่าชายเลน 7 ชนิด ประกอบด้วย แสมทะเล (2 ไอโซเลต) ผาดแดง (4 ไอโซเลต) จาก (1 ไอโซเลต) โกงกางใบเล็ก (3 ไอโซเลต) โกงกางใบใหญ่ (5 ไอโซเลต) ลำแพน (1 ไอโซเลต) และตะบูนขาว (2 ไอโซเลต) นำแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar overlay ผลการทดลองพบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ไอโซเลต RA02, RA05 และ X03 แสดงประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ดีที่สุด เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลต X03 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* ดีที่สุด โดยมีความกว้างโซนยับยั้งเท่ากับ 18.5 และ 20.0 มิลลิเมตรตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต X03 จัดอยู่ในสกุล *Actinomadura* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98.93 % กับ *A. atramentaria* IFO 14695^T (U49000) มากที่สุด งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกของ *Actinomadura* ซึ่งเป็นเอนโดไฟท์ที่ได้จากรากตะบูนขาวพืชป่าชายเลนในประเทศไทย จึงแสดงให้เห็นว่าพืชป่าชายเลนเป็นแหล่งสำคัญในการค้นหาแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำสำคัญ: เอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรีย กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ พืชป่าชายเลน

คำนำ

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีนและไซโทซีนในจีโนมสูงตั้งแต่ 51% ใน *Corynebacterium* บางชนิด ไปจนถึงมากกว่า 70% ใน *Streptomyces* และ *Frankia* ยกเว้น *Tropheryma whipplei* ที่เป็นเชื้อก่อโรคและมีปริมาณเบสกวานีนและไซโทซีนน้อยกว่า 50% (Ventura *et al.*, 2007) แอคติโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลากหลายตั้งแต่รูปท่อน (เช่น สกุล *Arthrobacter* spp.) รูปร่างกลม (เช่น สกุล *Micrococcus* spp.) ไปจนถึงมีการเจริญเป็นเส้นใยที่แตกแขนง (เช่น สกุล *Streptomyces* spp.) และเส้นใยที่หักเป็นท่อน (เช่น สกุล *Nocardia* spp.) (Whitman *et al.*, 2012) แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่

สามารถผลิตเอนไซม์และสารเมทาบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา สารต้านมะเร็ง สารต้านเนื้องอก และสารต้านปรสิต (Butler, 2004) ปัจจุบันการค้นหาสารเมทาบอลิต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่ง เพื่อรับมือกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปัจจุบันมีแนวโน้มติดต่อขยายตัวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผ่านมานั้นมักพบสารประกอบชนิดเดิมที่รู้จักอยู่ก่อนแล้ว (Koehn & Carter, 2005) และในปัจจุบันจุลินทรีย์ก่อโรคมะเร็งมีแนวโน้มติดต่อขยายตัวเพิ่มขึ้นทำให้การรักษาด้วยยาชนิดเดิมไม่ได้ผล (Mancuso *et al.*, 2021) ทำให้มีความจำเป็นค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

ป่าชายเลนเป็นพื้นที่ที่อยู่ในแนวเชื่อมต่อระหว่างผืนแผ่นดินกับพื้นที่น้ำทะเลในเขตร้อน (Tropical region) และกึ่งร้อน (Subtropical region) ของโลก เป็นระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะตัว มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพ เป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดรวมถึงแอกติโนแบคทีเรีย เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแอกติโนแบคทีเรียและค้นพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่จากดินและพืชป่าชายเลน (Azman *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2018) แอกติโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชหรือที่เรียกว่าเอนโดไฟท์ (endophyte) กำลังได้รับความสนใจมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากมีรายงานการแยกแอกติโนแบคทีเรียจากพืชหลากหลายชนิดรวมถึงพืชป่าชายเลน และในจำนวนนี้พบว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เช่น salinosporamides และ xiamycins เป็นต้น (Xu *et al.*, 2014; Matsumoto & Takahashi, 2017) สำหรับการศึกษาเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรียจากพืชป่าชายเลนในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับในดินตะกอนป่าชายเลน ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าชายเลนกระจายอยู่ใน 24 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่มากกว่า 2.86 ล้านไร่ และมีพันธุ์พืชป่าชายเลนมากกว่า 95 ชนิด (กลไกการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารความหลากหลายทางชีวภาพ, 2565) และอาจเป็นแหล่งของแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้แยกแอกติโนแบคทีเรียจากรากพืชป่าชายเลน 7 ชนิด ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย และระบุสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ข้อมูลที่ได้นี้อาจไปสู่การค้นพบสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อยอดในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและแยกแอกติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างรากพืชจากป่าชายเลนคลองโค่น อ.คลองโคน จ.สมุทรสงคราม จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) จาก (*Nypa fruticans*) ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatum*) ฝาดแดง (*Lummitzera littorea*) ลำแพน (*Sonneratia ovata*) และป่าชายเลนโครงการพระราชดำริแหลมผักเบี้ย อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ แสมทะเล (*Avicennia marina*) เลือกต้นพืชที่มีสภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่มีการเข้าลายของโรคและแมลง ทำความสะอาดรากพืชด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่าน ชั่งราก 1 กรัม นำมาผ่านขั้นตอนการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิว (surface sterilization) โดยเขย่าในสารละลาย 70 % (v/v) เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เข้มข้น 2.5 % (v/v) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำน้ำล้างรากครั้งสุดท้ายเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร nutrient agar (NA) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดจุลินทรีย์ที่พื้นผิว

ตัดรากพืชให้มีความยาวประมาณ 2–3 เซนติเมตร บดด้วยโกร่งในสารละลาย 0.85 % (w/v) NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารแขวนลอยรากปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร starch casein agar (SCA) (Küster & Williams, 1964) ที่เติมยาปฏิชีวนะ nalidixic acid (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ketoconazole (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญของแอกติโนแบคทีเรีย คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium 2 (ISP2) (Shirling & Gottlieb, 1966) เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเอียง ISP2 เก็บสปอร์และเส้นใยในสารละลายกลีเซอรอล 20 % ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มแบบเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจุลินทรีย์มาปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($OD_{600} = 0.25$)

ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีราดทับ (agar overlay method) ตามวิธีการที่อธิบายโดย Mingma *et al.* (2014) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ หากค่าอัตราส่วนการยับยั้ง โดยคำนวณจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มม.)หารด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อบริเวณส่วนใสด้านบน (supernatant) ฝากกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน (filter membrane) ขนาดรูพรุน (pore size) 0.45 ไมครอน และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion

เตรียมอาหาร ISP2 ที่มีความหนามากกว่าปกติ เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วผิวหน้าจานอาหาร จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหารให้เป็นหลุม (well) แล้วใส่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้อาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และยาปฏิชีวนะ สเตอโรปโตมัยซิน (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นชุดควบคุมผลบวก

(positive control) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มจานอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C สำหรับ *B. cereus*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* และอุณหภูมิ 37 °C สำหรับ *E. coli* ตรวจผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร

4. การระบุชนิดแอกติโนแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว yeast extract dextrose (YD) เป็นเวลา 5–7 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง สกัดดีเอ็นเอโดยใช้การสั่นสะเทือนคลื่นอัลตราโซนิค (sonication) ตามวิธีของ Také *et al.* (2015) โดยนำตะกอนเซลล์เข้าเครื่องล้างอัลตราโซนิค (sonicator) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลายส่วนใสด้านบนมาเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 1F (5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3') และไพรเมอร์ 1530R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') (Kataoka *et al.*, 1997) สารเคมีในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 2X PCR Master mixed (ประกอบด้วย dNTP mixture 2.5 mM, i-Tap DNA polymerase 2.5 Unit, 1X PCR reaction buffer และ Gel loading buffer) ไพรเมอร์ 1F และไพรเมอร์ 1530R อย่างละ 0.4 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 50 ไมโครลิตรด้วยน้ำดีไอออไนซ์ สภาวะในการทำ PCR เริ่มต้นจาก pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ final-extension ต่อที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ

ไอโหด (DNA sequencing) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzbioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) (Yoon *et al.*, 2017)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแอกติโนแบคทีเรียจากรากพืชป่าชายเลน

แยกแอกติโนแบคทีเรียจากรากพืชป่าชายเลน โดยนำตัวอย่างรากพืชมาล้างด้วย 75 % เอทานอล เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยสารละลาย 2.5 % โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ เป็นเวลา 5 นาที พบว่าสามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวตัวอย่างได้ดี พบการเจริญของแบคทีเรียเล็กน้อยหรือไม่พบเลยในตัวอย่างน้ำล้างรากครั้งสุดท้ายที่เกลี่ยบนอาหาร NA การใช้สารเคมีทำความสะอาดผิวพืชถือเป็นขั้นตอนสำคัญของการแยกจุลินทรีย์กลุ่มเอนโดไฟท์ เป็นการกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนบริเวณผิวตัวอย่างให้หมดไป เพื่อให้มั่นใจว่าจุลินทรีย์ที่แยกเป็นเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ไม่ใช่กลุ่มอีพิไฟท์ (epiphyte) งานวิจัยนี้แยกเอนโดไฟท์แอกติโนแบคทีเรียโดยใช้อาหาร starch casein agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ ketoconazole และ nalidixic acid เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Niyomvong *et al.* (2012) และ Himaman *et al.* (2016) เลือกใช้ยาปฏิชีวนะ ketoconazole และ nalidixic acid ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการซึ่งส่วนใหญ่เจริญเร็วกว่า ทำให้แอกติโนแบคทีเรียสามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารคัดเลือกได้ ketoconazole เป็นสารต้านเชื้อราในกลุ่มอิมิดาโซล (imidazole) มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ (Herrick & Hashmi, 2022) ในขณะที่ nalidixic acid เป็นสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ โดยไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ (Crumplin & Smith, 1975)

อาหาร SCA เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเส้นใย

โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* (Küster & Williams, 1964; Shirling & Gottlieb, 1966) และนิยมใช้เป็นอาหารสำหรับแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน และตัวอย่างอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อม หลังบ่มจนอาหารผ่านไป 1 สัปดาห์ จะพบการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียที่มีโคโลนีขนาดเล็กและมีลักษณะแข็ง ผิวหน้าโคโลนีแห้ง อาจพบการสร้างสปอร์บนผิวหน้าโคโลนี ทำให้มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือกำมะหยี่ ส่วนมากสร้างสปอร์สีเทาและสีขาว คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร ISP2 พบว่าสามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 18 ไอโซเลต จากรากพืช 7 ชนิด (Table 1) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดพืช พบว่าแยกแอกติโนแบคทีเรียจากรากโกงกางใบใหญ่ได้เป็นจำนวนมากที่สุด คือ 5 ไอโซเลต รองลงมาคือ รากผาดแดง จำนวน 4 ไอโซเลต รากโกงกางใบเล็ก จำนวน 3 ไอโซเลต รากตะบูนและแสมทะเล จำนวน 2 ไอโซเลต เท่ากัน และรากต้นจากและลำแพน อย่างละ 1 ไอโซเลต งานวิจัยที่แยกเอนโดไฟท์แอกติโนแบคทีเรียจากรากพืชป่าชายเลน เช่น งานวิจัยของ Mesta *et al.* (2018) แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลต จากรากโกงกางใบเล็กและลำพูในพื้นที่ป่าชายเลนประเทศอินเดีย Jiang *et al.* (2018) แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต จากรากพังกาหัวสุ่มดอกแดง ป่าชายเลนประเทศจีน ในขณะที่ Quach *et al.* (2022) แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต จากพังกาหัวสุ่มดอกแดงในพื้นที่ป่าชายเลนประเทศเวียดนาม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tung *et al.* (2022) แยกแอกติโนแบคทีเรียจากต้นแสมทะเลในพื้นที่ป่าชายเลนประเทศเวียดนามได้ทั้งสิ้น 9 ไอโซเลต และพบแอกติโนแบคทีเรียในรากปริมาณมากที่สุด นอกจากรากแล้วสามารถพบแอกติโนแบคทีเรียจากส่วนอื่นๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ลำต้น และเปลือก (Tung *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2018) โดยทั่วไปแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชมักมีจำนวนไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับในดินตะกอนป่าชายเลน โดยมีจำนวนแตกต่างกันตามชนิดของพืช อายุพืช

รวมถึงสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญ (Govindasamy & Franco, 2013)

2. การทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรีย

เมื่อนำแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 18 ไอโซเลต มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี agar overlay ผลการทดลองพบว่าแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 8 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด (Table 2) มีเพียงไอโซเลตเดียวคือ RA02 ซึ่งแยกจากรากโกบไบเล็กสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด ส่วนไอโซเลต RA05 ซึ่งแยกจากพืชชนิดเดียวกัน ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 3 ชนิด และไม่ยับยั้ง *P. aeruginosa* แอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้มากที่สุด (จำนวน 6 ไอโซเลต) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tung *et al.* (2022) รายงานว่าเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากแสมทะเลให้ผลการยับยั้ง *B. cereus* มากที่สุด ในงานวิจัยนี้ ไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้ง *B. cereus* สูงที่สุดคือ X03 ซึ่งแยกจากรากตะบูน มีค่าอัตราส่วนการยับยั้งเท่ากับ 6.71 นอกจากนี้ ไอโซเลต X03 ยังสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้สูงที่สุดเช่นกัน โดยมีค่าอัตราส่วนการยับยั้งเท่ากับ 6.55 มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *S. aureus* ในขณะที่มีเพียง 3 และ 1 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่รายงานว่าแอคติโนแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Gurung *et al.*, 2010; Mingma *et al.*, 2014) สาเหตุที่แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากความแตกต่างทางองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคนที่เป็นชั้นหนาหนึ่งชั้น ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคนที่เป็นชั้นบาง และมีชั้นของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) อยู่ชั้นนอกสุด ซึ่งช่วยป้องกันแบคทีเรียจากรากสารต้านแบคทีเรีย (Nikaido, 1989;

Rosenfeld & Shai, 2006) พบว่า *P. aeruginosa* มีกลไกในการต้านทานต่อสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ การสร้างสารเมือกและเจริญเป็นชั้นไบโอฟิล์ม (Neut *et al.*, 2005) ซึ่งช่วยป้องกันการซึมผ่านของสารต้านจุลินทรีย์ การมีพลาสมิดที่มียีนที่ควบคุมการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Bonomo & Szabo, 2006) ทำให้ผลการทดสอบพบจำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* น้อย

คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต คือ RA02, RA05 และ X03 มาทดลองในขั้นทุติยภูมิ (secondary screening) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าไอโซเลต X03 ให้ผลการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* สูงที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 18.5 และ 20.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Figure 1) แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เช่นเดียวกับไอโซเลต RA05 ให้ผลการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* มีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 14.5 และ 17.5 มิลลิเมตร (Table 3) ในขณะที่ไอโซเลต RA02 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้เลย ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อทดสอบในขั้นปฐมภูมิ (primary screening) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการทดสอบในขั้นทุติยภูมิเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าแม้เป็นเชื้อเดียวกันอาจให้ผลการทดลองแตกต่างกันได้ สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (Sapkota *et al.*, 2020; Gurung *et al.*, 2010) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะการเจริญของแอคติโนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะสร้างเส้นใยที่แตกแขนง ในขณะที่เมื่อเจริญในอาหารเหลวเส้นใยมีการแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ (Bushell, 1993) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เป็นต้น งานวิจัยของ Ravikumar *et al.* (2011) ทดสอบฤทธิ์

การต้านจุลินทรีย์ของแอกติโนแบคทีเรีย ไอโซเลต ACT1 ที่แยกจากพืชป่าชายเลน Karangkadu ประเทศอินเดีย พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Klebsiella* sp. โดยมีขนาดโซนยับยั้งเท่ากับ 13 ± 1.12 มิลลิเมตร

3. การระบุชนิดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต X03 บนอาหาร ISP2 พบว่าโคโลนีมีขนาดเล็กและแข็งคล้ายแผ่นหนัง โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างสปอร์ และสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลเข้ม แตกต่างกับบนอาหาร ISP3 (oatmeal agar; Shirling & Gottlieb, 1966) ที่มีการสร้างสปอร์สีขาว ไม่สร้างรงควัตถุ เส้นใยมีขนาดเล็กและแตกแขนง (Figure 2) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต X03 (ขนาด 1,039 คู่เบส, accession number OP714446) พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Actinomadura* sp. โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ

Actinomadura atramentaria IFO 14695^T (U49000) มากที่สุด เท่ากับ 98.93 % (11/1032) ซึ่งมีรายงานว่าแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ cinnamycin B ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ (Kodani *et al.*, 2016) และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่อยู่ในกลุ่ม polyether (Nakamura & Isono 1983; Berdy *et al.* 1987a, b, c) กลุ่ม anthracyclin (Berdy *et al.* 1987a, b, c; Bycroft *et al.* 1988) กลุ่ม naphthoquinone (Kakinuma *et al.* 1993) และกลุ่ม macrolactam (Hedge *et al.* 1992) มีรายงานการแยกแอกติโนแบคทีเรียสกุลนี้ส่วนใหญ่จากดิน และพืชหลากหลายชนิด เช่น จิกน้ำ ต้นหว้า (Suksaard *et al.*, 2017; Rachniyom *et al.*, 2018; Rachniyom *et al.*, 2015) แต่ยังไม่มียางานการแยกแอกติโนแบคทีเรียสกุลนี้จากรากตะบูนมาก่อน ไอโซเลต X03 จะถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ตัวทำละลายและวิเคราะห์ชนิดของสารเพิ่มเติมต่อไป

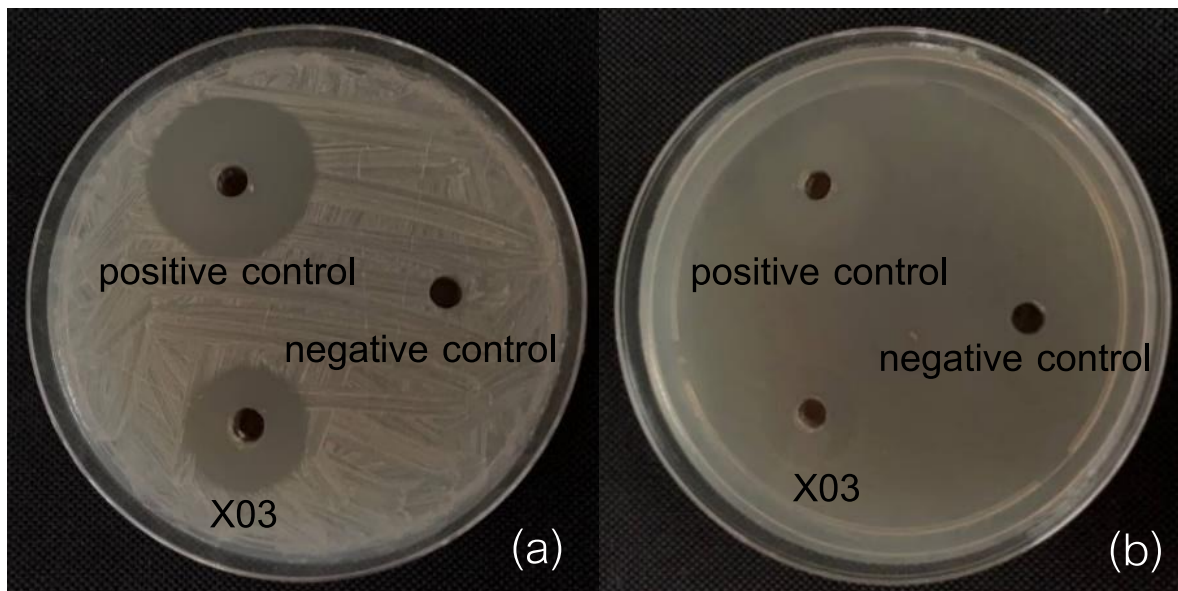


Figure 1 Antibacterial activities of endophytic actinobacteria isolate X03 against *S. aureus* (a) and *B. cereus* (b) using agar well diffusion assay

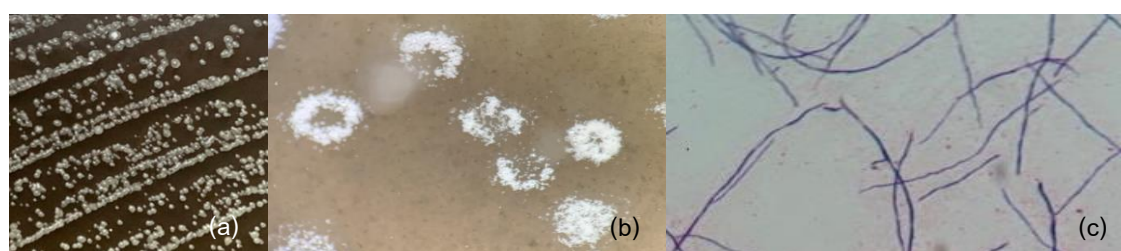


Figure 2 The colony morphology of isolate X03 on ISP2 (a) and ISP3 that showing white spore (b) and branched, non-fragmenting mycelia (1,000X) (c) grown for 12 days at 30 °C

Table 1 Endophytic actinobacteria isolated from mangrove plant's roots collected from mangrove forest in Samut Songkhram and Phetchaburi provinces, Thailand

Plant species*	Number of actinobacteria (isolates)	Isolation code
<i>Avicennia marina</i>	2	AM01, AM02
<i>Lummitzera littorea</i>	4	L03, L04, L10, L11
<i>Nypa fruticans</i>	1	NF01
<i>Rhizophora apiculata</i>	3	RA01, RA02, RA05
<i>Rhizophora mucronata</i>	5	RM03, RM04, RM05, RM08, RM09
<i>Sonneratia ovata</i>	1	S01
<i>Xylocarpus granatum</i>	2	X01, X03
Total	18	

Note *All plant samples were collected from Klong Kone Mangrove Forest, Samut Songkhram, except *Avicennia marina* that was collected from Laem Phak Bia Mangrove Forest, Phetchaburi (Laemphakbia Subdistrict Administrative Organization).

Table 2 Antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from some mangrove plants against four pathogenic bacteria using agar overlay method

Isolates	Inhibition capacity			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AM02	–	–	4.54	–
L04	2.13	–	–	–
L11	–	3.80	–	–
RA02	1.92	2.50	3.30	3.14
RA05	2.83	3.39	1.40	–
RM04	4.65	–	–	–
RM05	4.27	4.47	–	–
X03	6.71	6.55	–	–

Note – = not inhibited

Table 3 Inhibition zone of the potential endophytic actinobacteria against tested bacteria using agar well diffusion method

Isolates	Inhibition zone (mm.)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
RA02	-	-	-	-
RA05	14.5	17.5	-	-
X03	18.5	20.0	-	-
positive control*	31.0	28.5	24.6	26.9

Note *streptomycin (50 µg/ml)

สรุป

เอนโดไฟติกแอกติโนแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต แยกจากรากพืชป่าชายเลน 7 ชนิด โกงกางใบใหญ่ (5 ไอโซเลต) โกงกางใบเล็ก (3 ไอโซเลต) จาก (1 ไอโซเลต) ตะบูน (2 ไอโซเลต) ฝาดแดง (4 ไอโซเลต) ลำแพน (1 ไอโซเลต) และเสมทะเล (2 ไอโซเลต) ในจำนวนนี้มี 8 ไอโซเลต แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar overlay ไอโซเลต RA02 และ RA05 ซึ่งแยกจากรากโกงกางใบเล็ก และไอโซเลต X03 ซึ่งแยกจากรากตะบูน ให้ผลการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* สูงที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเท่ากับ 18.5 และ 20.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ) เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของทั้ง 3 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าไอโซเลต X03 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด โดยมีความกว้างวงใสต่อการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* เท่ากับ 18.5 และ 20.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า ไอโซเลต X03 จัดอยู่ในสกุล *Actinomadura* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Actinomadura atramentaria* IFO 14695^T (U49000) มากที่สุด (99.93 %)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวอจिता จันทรไย นายณภัทร สีมาสุรพจน์ และนายบัญชา วงศ์ไพบูลย์ นักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน โดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (โครงการ รวม.มก.) และรายวิชาโครงการวิทยาศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2562 ที่เป็นจุดเริ่มต้นของงานวิจัย ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงเรียนวัดคลองโคน จ.สมุทรสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างพืชป่าชายเลน งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปีงบประมาณ 2563

เอกสารอ้างอิง

- กลไกการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารความหลากหลายทางชีวภาพ. (2565). ระบบนิเวศป่าชายเลน กองจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ, เมื่อ 28 ตุลาคม 2565, จาก https://chm-thai.onep.go.th/?page_id=426.
- Azman, I., Othman A.S., Velu S.S., Chan K.G. & Lee L.H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 6, 856. doi: 10.3389/fmicb.2015.00856.

- Berdy, J., Aszalos A. & McNitt K.L. (1987a). *Handbook of antibiotic compounds, Volume XIII, Part 1*. Boca Raton: CRC Press.
- Berdy, J., Aszalos A. & McNitt K.L. (1987b). *Handbook of antibiotic compounds, Volume XIII, Part 2*. Boca Raton: CRC Press.
- Berdy, J., Aszalos A. & McNitt K.L. (1987c). *Handbook of antibiotic compounds, Volume XIII, Part 3*. . Boca Raton: CRC Press.
- Bonomo, R.A. & Szabo D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa* [Issue Supplement]. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2), S49–S56. doi: 10.1086/504477.
- Bushell, M.E. (1993). A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 76(2), 89–93. doi: 10.106/0922-338X(93)90062-D.
- Butler, M.S. (2004). The role of natural products chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141–2153. doi: 10.1021/np040106y.
- Bycroft, B.W., Higon, A., & Roberts, A.D. (1988). *Dictionary of antibiotics and related substances*. London: Chapman and Hall.
- Crumplin, G.C. & Smith J.T. (1975). Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 8(3), 251–261. doi: 10.1128/AAC.8.3.251.
- Govindasamy, V. & Franco C.M.M. (2013). *Endophytic actinobacteria: diversity and ecology. Advances in Endophytic Research*. New Delhi, Springer.
- Gurung, T.D., Sherpa C., Agrawal V.P. & Lekhak B. (2010). Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*, 10, 173–182. doi: 10.3126/njst.v10i0.2957.
- Hedge, V., Patel M., Horan A., Gullo V., Marquez J., Gunnarsson I., Gentile F., Loebenber D., King A., Puar M. & Pramanik B. (1992). Macrolactams: a novel class of antifungal antibiotics produced by *Actinomadura* spp. SC1776 and SCC 1777. *The Journal of Antibiotics*, 45, 624–632. doi: 10.7164/antibiotics.45.624.
- Herrick, E.J. & Hashmi M.F. (2022). *Antifungal ergosterol synthesis inhibitors*. Retrieved October 18, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551581/>
- Himaman, W., Thamchaipenet A., Pathom-aree W. & Duangmal K. (2016). Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. *Microbiological Research*, 188–189, 42–52. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.011.

- Hong, K., Gao A.-H., Xie Q.-Y., Gao H., Zhuang L., Lin H.-P., Yu H.-P., Li J., Yao X.-S., Goodfellow M. & Ruan J.-S. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44. doi: 10.3390/md7010024.
- Jiang, Z.K., Tuo L., Huang D.L., Osterman I.A., Tyurin A.P., Liu S.W., Lukyanov D.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Korshun V.A., Li F.N. & Sun C.H. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00868.
- Kakinuma, S., Susuki H., Hatori M., Saitoh K., Hasegawa T., Furumai T. & Oki T. (1993). Biosynthesis of the pradimicin family of antibiotics. III. Biosynthetic pathway of both pradimicins and benanomicins. *The Journal of Antibiotics*, 46(3), 430–440. doi: 10.7164/antibiotics.46.430.
- Kataoka, M., Ueda K., Kudo T., Seki T. & Yoshida T. (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), 249–255. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12578.x.
- Kodani, S., Komaki H., Ishimura S., Hemmi H. & Ohnishi-Kameyama M. (2016). Isolation and structure determination of a new lantibiotic cinnamycin B from *Actinomadura atramentaria* based on genome mining. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(8), 1159–1165. doi: 10.1007/s10295-016-1788-9.
- Koehn, F.E. & Carter G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), 206–220. doi: 10.1038/nrd1657.
- Küster, E. & Williams S.T. (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, 202, 928–929. doi: 10.1038/202928a0.
- Matsumoto, A. & Takahashi Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514–519. doi: 10.1038/ja.2017.20.
- Mesta, S.C., Rudrappa O., Meghana S.H., Manu H.M., Kavana S. & Talib M. (2018). Phosphate solubilizing endophytic actinomycetes from mangrove plants *Rhizophora mucronata* and *Sonneratia caseolaris* and its effect on Seedling vigour. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(3), 1172–1178. doi:10.5958/0974-360X.2018.00219.6.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. doi: 10.3390/pathogens10101310.

- Mingma, R., Pathom-aree W., Trakulnaleamsai S., Thamchaipenet A. & Duangmal K. (2014). Isolation of rhizospheric and roots endophytic-actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. glycine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 271–280. doi: 10.1007/s11274-013-1451-9.
- Nakamura, G. & Isono E.K. (1983). A new species of *Actinomadura* producing a polyether antibiotic, cationomycin. *The Journal of Antibiotics*, 36(11), 1468–1472. doi: 10.7164/antibiotics.36.1468.
- Neut, D., Hendriks J.G.E., van Horn J.R., van der Mei H.C. & Busscher H.J. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded bone cement. *Acta Orthopaedica*, 76(1), 109–114. doi: 10.1080/00016470510030427.
- Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(11), 1831–1836. doi: 10.1128/aac.33.11.1831.
- Niyomvong, N., Pathom-Aree W., Thamchaipenet A. & Duangmal K. (2012). Actinomycetes from tropical limestone caves. *Chiang Mai Journal of Science*, 39(3), 373–388.
- Quach, N.T., Vu T.H.N., Bui T.L., Le T.T.X., Nguyen T.T.A., Ngo C.C. & Phi Q.T. (2022). Genomic and physiological traits provide insights into ecological niche adaptations of mangrove endophytic *Streptomyces parvulus* VCCM 22513. *Annals of Microbiology*, 72(27), doi: 10.1186/s13213-022-01684-6.
- Rachniyom, H., Matsumoto A., Indananda C., Duangmal K., Takahashi Y. & Thamchaipenet A. (2015). *Actinomadura syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(6), 1946–1949. doi: 10.1099/ijms.0.000203.
- Rachniyom, H., Matsumoto A., Inahashi Y., Take A., Takahashi Y. & Thamchaipenet A. (2018). *Actinomadura barringtoniae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1584–1590. doi: 10.1099/ijsem.0.002714.
- Ravikumar, S., Ibaneson S.J., Uthiraselvam M., Priya S.R., Ramu A. & Banerjee M.B. (2011). Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research*, 4(1), 294–296.

- Rosenfeld, Y. & Shai Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1758(9), 1513–1522. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.05.017.
- Sapkota, A., Thapa A., Budhathoki A., Sainju M., Shrestha P. & Aryal S. (2020). Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples. *International Journal of Microbiology*, 2020, doi: 10.1155/2020/27016584.
- Shirling, E.B. & Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species¹. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313–340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313.
- Suksaard, P., Pathom-aree W. & Duangmal K. (2017). Diversity and plant growth promoting activities of actinomycetes from mangroves. *Chiang Mai Journal of Science*, 44, 1210–1223.
- Také, A., Matsumoto A., Omura S. & Takahashi Y. (2015). *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. *The Journal of Antibiotics*, 68(5), 322–327. doi: 10.1038/ja.2014.162.
- Tung, Q.N., Lien B.T., Nguyen V.T.H., An N.T.T., Ha C. H. & Tien P.Q. (2002). Endophytic actinomycetes from mangrove plant *Avicennia marina* in Quang Ninh Province, Vietnam: Distribution, cytotoxicity, and antioxidant activities. *Academia Journal of Biology*, 44(3), 87–98. doi: 10.15625/2615-9023/17492.
- Ventura, M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F. & van Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07.
- Whitman, W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.-i. & Parte A. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5 The Actinobacteria* (2nd ed). New York: Springer.
- Xu, D.B., Ye W.W., Han Y., Deng Z.X. & Hong K. (2014). Natural products from mangrove actinomycetes. *Marine drugs*, 12(5), 2590–2613. doi: 10.3390/md12052590.
- Yoon, S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. & Chun J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755.