

กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียและการต้านไบโอฟิล์มของแอคติโนแบคทีเรีย
ที่แยกจากดินรอบรากพืชสมุนไพรบางชนิด

**Antibacterial Activities and Antibiofilm Formation of Actinobacteria Isolated from
Rhizospheric Soils of Some Medicinal Plants**

นลินทิพย์ ชื่นชูวงศ์¹, ฟน เสนารัตน์¹, จินตนาถ วงศ์ชวลิต¹ และ รัชณี มิ่งมา^{1*}

Nalinthip Chunchoo Wong¹, Fon Senarat¹, Jintanart Wongchawalit¹ and Ratchanee Mingma^{1*}

Received 8 May 2023, Revised 18 November 2023, Accepted 20 November 2023

ABSTRACT

Actinobacteria are an important group of Gram-positive bacteria capable to produce secondary metabolite with biological activities and has been used as antimicrobial agents and including antibiofilm formation. Actinobacteria are commonly found in soil, water, plant tissue and plant rhizosphere. The aim of this research was to investigate the antibacterial activity and antibiofilm formation of actinobacteria isolated from rhizospheric soils of three medicinal plants including *Andrographis paniculata*, *Cannabis sativa* and *Mitragyna speciosa* against *Bacillus cereus* TISTR 687, *Staphylococcus aureus* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa*. 40 actinobacteria isolates were recovered from rhizospheric soils of *A. paniculata* 17 isolates, *M. speciosa* 12 isolates and *C. sativa* 11 isolates. Out of these, 11 isolates were found to inhibit at least one tested bacteria. There were three isolates namely F17, KC11 and KT01 exhibited high potential of antimicrobial activity and were selected for antibiofilm formation test using the microtiter plate (MTP) assay. The results showed that the isolate KT01 exhibited the highest antibiofilm activity. Cell free supernatant of isolate KT01 inhibited biofilm formation of *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* ATCC 27853 *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa*, accounting for $11.69 \pm 0.06\%$, $19.32 \pm 0.05\%$, $23.57 \pm 0.37\%$ and $87.46 \pm 0.07\%$, respectively. Based on 16s rDNA gene analysis, the isolate KT01 (1,499 bp) was most closely related to *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316^T (100% similarity). This result demonstrated that actinobacteria, isolated from the rhizospheric soils of medicinal plants, are source of bioactive compounds to inhibit pathogenic bacteria and antibiofilm.

Keywords: Actinobacteria, Antibiofilm, Medicinal plant rhizosphere

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และถูกนำมาใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ แอคติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ เนื้อเยื่อพืชและในดิน

¹ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

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

รอบรากพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียและการต้านไบโอฟิล์มของ แอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) กัญชา (*Cannabis sativa*) และกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus cereus* TISTR 687, *Staphylococcus aureus* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* แอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 40 ไอโซเลต แยกได้จากดินบริเวณรอบรากฟ้าทะลายโจร จำนวน 17 ไอโซเลต ดินบริเวณรอบรากกระท่อม จำนวน 12 ไอโซเลต และดินบริเวณรอบรากกัญชา จำนวน 11 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 11 ไอโซเลต ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และมี 3 ไอโซเลต คือ KT01, KC11 และ F17 มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุดและคัดเลือกมาทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยวิธี microtiter plate (MTP) assay ผลการศึกษาพบว่าไอโซเลต KT01 มีกิจกรรมการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มดีที่สุด น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลต KT01 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ได้ $11.69 \pm 0.06\%$, $19.32 \pm 0.05\%$, $23.57 \pm 0.37\%$ และ $87.46 \pm 0.07\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต KT01 (1,499 คู่เบส) พบว่ามีความเหมือนกัน กับ *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316^T (100 เปอร์เซ็นต์) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า แอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบรากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้

คำสำคัญ: แอคติโนแบคทีเรีย การยับยั้งไบโอฟิล์ม ดินรอบรากพืชสมุนไพร

คำนำ

ไบโอฟิล์ม (biofilm) คือชั้นเมือกที่เกาะบนพื้นผิวที่มีความชื้นหรือมีของเหลวล้อมรอบ ภายในชั้นไบโอฟิล์มประกอบด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน คิดเป็น 10-15 เปอร์เซ็นต์ มาอยู่รวมกันและสร้างสารพอลิเมอร์ หรือ EPS (extracellular polymeric substance) ห่อหุ้มเซลล์ คิดเป็น 80-85 เปอร์เซ็นต์ของโครงสร้างไบโอฟิล์ม (Limoli *et al.*, 2015) ชั้นพอลิเมอร์นี้ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของยา เช่น ยาปฏิชีวนะและยามาเชื้อไม่ให้เข้าถึงเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในและมีผลทำให้ฤทธิ์ของยาอ่อนลง (Flemming and Wingender, 2010) ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มไม่ได้ผล และจุลินทรีย์มีโอกาสติดต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น การป้องกันและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm inhibition) มีหลายวิธี ได้แก่ การใช้วัสดุที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) เพื่อป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ การใช้สารยับยั้ง เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพร สารเมตาบอไลต์จากจุลินทรีย์ รวมถึงเอนไซม์และสารลดแรงตึงผิว (biosurfactant) ไปรบกวนการสื่อสารระหว่างแบคทีเรีย (quorum sensing) และทำลายชั้น

เมทริกซ์ EPS ของไบโอฟิล์ม (Goel *et al.*, 2021; Verderosa *et al.*, 2019)

แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเปอร์เซ็นต์ของเบสกวานีนและไซโทซีนในจีโนมสูงมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่มีการเจริญเป็นเส้นใยที่แตกแขนงและอัดกันแน่น ทำให้โคโลนี (colony) มีลักษณะแข็งแตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไป แอคติโนแบคทีเรียพบมากที่สุดในดิน โดยมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน และยังพบแอคติโนแบคทีเรียได้ในทุกสภาพแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำ ตะกอนใต้น้ำ เนื้อเยื่อพืช รวมถึงสภาพแวดล้อมที่สุดขั้ว (extreme habitats) แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคิดเป็นปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Bérdy, 2005) สารเหล่านี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ ใช้เป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา สารต้านมะเร็ง และสารกดภูมิคุ้มกัน

เป็นต้น (Jose *et al.*, 2021) พืชสมุนไพร (medicinal plant) เป็นพืชมีสรรพคุณทางยาและใช้รักษาโรคมมาตั้งแต่สมัยโบราณ พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Cowan, 1999) สารประกอบเหล่านี้มีต้นกำเนิดจากพืช และมีรายงานว่าสารบางชนิดมีต้นกำเนิดจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช (Castronovo *et al.*, 2021)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านแบคทีเรียและยับยั้งไบโอฟิล์มของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินรอบพืช 3 ชนิด คือ ฟ้ายะลวยใจ (*Andrographis paniculata*) กัญชา (*Cannabis sativa*) และกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) จัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เพื่อค้นหาสายพันธุ์แอคติโนแบคทีเรียที่มีแนวโน้มนำมาใช้ประโยชน์และแก้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างดินและแยกแอคติโนแบคทีเรีย

เก็บดินจากบริเวณรอบรากพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ ฟ้ายะลวยใจ กัญชา และกระท่อม ผึ่งดินให้แห้งในที่ร่ม แยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินโดยวิธีการเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ดูดสารละลายดินที่ระดับการเจือจาง 10^3 ถึง 10^5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร starch casein (SC) agar (Küster and Williams, 1964) ที่เติมยาปฏิชีวนะคีโตโคนาโซล (ketoconazole) 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกรดนาลิดิซิด (nalidixic acid) 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตการเจริญของแอคติโนแบคทีเรีย นำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) (Shirling and Gottlieb, 1966) และเก็บรักษาเชื้อในสารละลายกลีเซอรอล เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* TISTR 687, *Staphylococcus aureus* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้เทคนิค perpendicular เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Scientific, United States) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.25 หรือมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml (Kolarević *et al.*, 2016) เตรียมซัสเพนชัน (suspension) ของแอคติโนแบคทีเรียโดยเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 7-10 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์เต็มที่ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วชุดเส้นใยและสปอร์ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อจุ่มซัสเพนชัน (suspension) นำมาลากให้เป็นเส้นตรงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar (Hi-media, India) ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ก่อนหน้า ลากเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับการเจริญของแอคติโนแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) มีหน่วยเป็น มิลลิเมตร

3. การทดสอบการยับยั้งไบโอฟิล์ม

คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar ดีที่สุด นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็น 10 นาที นำส่วนใสด้านบน (supernatant) กรองด้วยเยื่อกรอง ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มบนไมโครเพลท 96 หลุม ด้วยวิธี microtiter plate (MTP) assay (O'Toole, 2011) เตรียมแบคทีเรียทดสอบโดย

ปรับความขุ่นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml ถ่ายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงไมโครเพลท 96 หลุม ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนใสปราศจากเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเพลท (plate) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทของเหลวทิ้งและล้างเซลล์ส่วนเกินด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline, PBS) เข้มข้น 1 เท่า จำนวน 3 ครั้ง ตีเซลล์ด้วยสารละลายเมทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที เทเมทานอลทิ้ง ย้อมไบโอฟิล์ม

$$\% \text{ Biofilm inhibition} = \left(\frac{A_{570} \text{ of biofilm without supernatant} - A_{570} \text{ of biofilm with supernatant}}{A_{570} \text{ of biofilm without supernatant}} \right) \times 100$$

4. การระบุชนิดแอกติโนแบคทีเรียโดยการ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

เลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว glucose yeast extract (GYE) agar สกัดดีเอ็นเอโดยใช้การสั่นสะเทือนคลื่นอัลตราโซนิก (sonication) ตามวิธีของ Také *et al.* (2015) โดยนำตะกอนเซลล์เข้าเครื่องล้างความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที ตูดสารละลายส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเอ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1F และ 1530R (Kataoka, 1997) สารเคมีในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 2X PCR Master mixed (ประกอบด้วย dNTP mixture 2.5 mM, i-Taq DNA polymerase 2.5 Unit, 1X PCR reaction buffer) ไพรเมอร์ 1F และ 1530R ชนิดละ 0.4 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ สภาวะในการทำ PCR เริ่มต้นจาก pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศา

ด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลต เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 นาที เทสีส่วนเกินทิ้งและล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 2 ครั้ง ละลายสีคริสตัลไวโอเลตด้วยสารละลายเอทานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสน, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไบโอฟิล์ม ตามสูตรดังนี้

เซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น final-extension ต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator (SMOBiO Technology. Inc, Taiwan) จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป (Favorgen biotech, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) ที่บริษัท Bionics (ประเทศเกาหลีใต้) นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ EzbioCloud (<http://ezbiocloud.net>) (Yoon *et al.*, 2017) ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูล GenBank สร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ Neighbor-joining และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแอกติโนแบคทีเรีย

แยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินรอบรากพืชสมุนไพรโดยใช้อาหาร SC หลังบ่มผ่านไป 7 วัน พบการเจริญของแอกติโนแบคทีเรีย โคลินี่มีขนาดเล็กและแข็ง ติดแน่นกับเนื้อวุ้น โคลินี่ไม่แผ่ขยายขนาด

ผิวหน้าโคโลนีด้าน พบการสร้างสปอร์สีเทาและสีขาว (Figure 1) ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือผงชอล์ค (chalk) คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์ แยกแอกติโนแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 40 ไอโซเลต โดยแยกจากดินรอบรากฟ้าทะเลลายโจรได้จำนวนมากที่สุด 17 ไอโซเลต รองลงมาคือ กระเทียม และกะหล่ำ จำนวน 12 และ 11 ไอโซเลต ตามลำดับ (Table 1) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Khamna *et al.* (2009) ซึ่งแยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 442 ไอโซเลต จากดินรอบรากพืชสมุนไพร 16 ชนิด คือ เหงือกปลาหมอ หญ้าพันงูขาว ผักโขม สเลดฝรั่งพอน ตัวผู้ กระชาย ขมิ้นขาว ตะไคร้ ตะไคร้หอม หญ้าแห้วหมู หญ้าคา ข่า กระเพรา เตยหอม ทองพันชั่ง หนอนตายหยาก และขิง พบว่าดินบริเวณรอบรากขมิ้นขาวคัดแยกได้แอกติโนแบคทีเรียจำนวนมากที่สุด (51 ไอโซเลต) รองลงมาคือดินรอบรากเตยหอม (47 ไอโซเลต) และดินรอบรากกระเพรา (38 ไอโซเลต) และแยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินรอบรากแห้วหมูได้น้อยที่สุด (11 ไอโซเลต) นอกจากนี้

Intra *et al.* (2011) ได้แยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินรอบรากพืชจำนวน 39 ตัวอย่าง ที่เก็บจากสวนผลไม้ จ.จันทบุรี จ.เพชรบุรี จ.หนองบัวลำภู และกรุงเทพฯ ได้แอกติโนแบคทีเรียจำนวน 304 ไอโซเลต ส่วน Li *et al.* (2019) แยกแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 64 ไอโซเลต จากดินรอบรากแสมแดง (*Aegiceras corniculatum*) จำนวน 4 ตัวอย่าง ที่เก็บจากป่าชายเลน มณฑลฝูเจี้ยนและเหมาเหว่ย ประเทศจีน ดินรอบรากพืชเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยพบแอกติโนแบคทีเรียมากเป็นอันดับ 3 รองจากกลุ่มอะซิโดแบคทีเรีย (*Acidobacteria*) และ โปรติโอแบคทีเรีย (*Proteobacteria*) (Wang *et al.*, 2022) จุลินทรีย์ที่อาศัยในดินรอบรากพืชได้รับสารอาหารจำพวกกรดอะมิโน น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต วิตามิน โปรตีน และกรดอินทรีย์ที่รากพืชหลั่งออกมาภายนอก ที่เรียกว่า root exudates เพื่อใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย

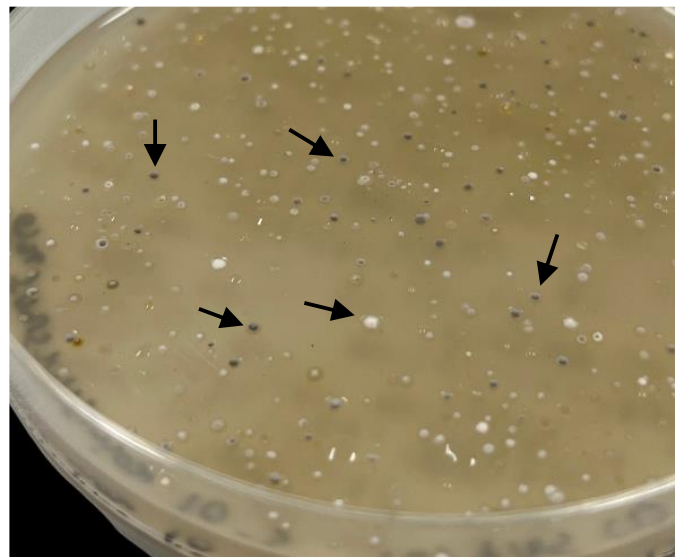


Figure 1 Actinobacterial colonies indicated by the arrow on starch casein agar plate incubated at 28 °C for 14 days

Table 1 Number of actinobacteria isolated from medicinal plant rhizosphere

Medicinal plant rhizosphere	Number of isolates	Isolation code
<i>Andrographis paniculata</i>	17	F01, F02, F03, F04, F05, F06, F07, F08, F09, F10, F11, F14, F17, F18, F20, F21, F22
<i>Cannabis sativa</i>	11	KC01, KC02, KC04, KC05, KC07, KC08, KC09, KC10, KC11, KC14, KC15
<i>Mitragyna speciosa</i>	12	KT01, KT02, KT03, KT04, KT05, KT06, KT08, KT09, KT10, KT11, KT12, KT13

Note: Isolation code refers to the first alphabet of plant common name in Thai; F = fah-tha-lai-jon (*Andrographis paniculata*); KC = kan-cha (*Cannabis sativa*); KT = kra-thom (*Mitragyna speciosa*).

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

จุลินทรีย์ก่อโรค

จากการทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* พบว่าจำนวน 11 ไอโซเลต แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด (Table 2) ในจำนวนนี้มีเพียง 3 ไอโซเลต คือ F17, KC11 และ KT01 ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด ไอโซ

เลต KT01 แยกจากดินรอบรากกระท่อม ให้ผลการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 27853 และ *B. cereus* TISTR 687 สูงที่สุด มีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 35.5 และ 17.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไอโซเลต KC11 แยกจากดินรอบรากกัญชา ให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 สูงที่สุด มีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 20.5 มิลลิเมตร (Figure 2) และไอโซเลต F17 แยกจากดินรอบรากฟ้าทะลายโจร ให้ผลการยับยั้ง *P. aeruginosa* สูงที่สุด มีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 10 มิลลิเมตร ดังนั้นจึงคัดเลือกทั้ง 3 ไอโซเลต มาทดสอบในขั้นต่อไป

Table 2 Antimicrobial activity of actinobacteria by perpendicular streak method

Isolation code	Inhibition zone (mm.)			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	TISTR 687	ATCC 27853	ATCC 25922	
F01	7.5	21.5	-	-
F06	8.5	29.5	-	-
F09	-	27.5	-	-
F10	2	17.5	3.5	-
F11	-	1.5	-	-
F14	10	14	-	-
F17	12	18.5	16.5	10
KC11	14	15	20.5	5.5
KT01	17.5	35.5	7.5	2.5
KT03	-	-	-	3.5
KT05	-	34	7.5	-

Note: - = no inhibition



Figure 2 Antimicrobial activity of actinobacteria isolate KC11 by perpendicular method.

Note: Bacterial strains from top to bottom line: *B. cereus* TISTR 687, *E. coli* ATCC 25922,

P. aeruginosa and *S. aureus* ATCC 27853, respectively

จากผลการทดลองพบว่าแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Janatiningrum and Lestari (2022) ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 34 ไอโซเลต ที่แยกจากดินรอบรากสาหล่าลิ้นทอง (*Ficus deltoidea*) พบจำนวน 21 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 3061 และ *S. aureus* ATCC 6538 และจำนวน 3 ไอโซเลตที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 8739 ส่วน Kumari *et al.* (2019) ศึกษาสารเมทาบอลิต์ที่สกัดด้วยทำละลายจากแอกติโนแบคทีเรีย ไอโซเลต AIA29 ที่แยกจากดินรอบรากอ้อย พบว่าสารสกัดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ สาเหตุที่แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ชั้นหนาเพียงชั้นเดียว ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ประกอบด้วยชั้นเปปทิโดไกลแคนที่เป็นชั้นบางกว่าอยู่ด้านใน และมีชั้นของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) อยู่ชั้นนอกสุดที่เรียกว่า outer membrane ซึ่งเป็นชั้นที่ช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสารต้านแบคทีเรีย (Nikaido, 1989;

Rosenfeld and Shai, 2006) ส่วนกลไกอื่นๆ ที่ทำให้แบคทีเรียต้านทานต่อสารยับยั้ง ได้แก่ การสร้างสารเมือก การมีพลาสมิดที่มียีนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา (Michaelis and Grohmann, 2023; Singh *et al.*, 2021) เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างดินรอบรากพืชแต่ละชนิดพบว่าแอกติโนแบคทีเรียจากดินรอบรากฟ้าทะลายโจรมีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียเป็นจำนวนมากที่สุด (7 ไอโซเลต) ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย นิยมใช้ในการรักษาโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนบน และโรคติดเชื้อต่างๆ สารสำคัญที่พบในฟ้าทะลายโจร ได้แก่ สารในกลุ่มไมโตเทอร์ปีนแลคโตน (diterpene lactones) ไดเทอร์ปีนไกลโคไซด์ diterpene glycosides) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycosides) (Rakphet *et al.*, 2022) ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชและดินบริเวณรอบรากพืชมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และส่งผลต่อการสร้างออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในพืช (Rizvi *et al.*, 2022; Vaghela & Gohe, 2023) นอกจากนี้ Li *et al.* (2022) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* sp. ที่แยกจากฟ้าทะลายโจร สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับไดเทอร์ปีน

แลคโตน สารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระ ส่วนกระท่อมและกัญชาแต่เดิมถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษ ปัจจุบันจัดเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้บรรเทาอาการปวดชนิดต่างๆ พบสารสำคัญ ได้แก่ แคนนาบินอยด์ (cannabinoids) ในกัญชา และไมทราไจนีน (mitragynine) ในกระท่อม (Prawatviteesuk *et al.*, 2022)

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

จากการศึกษาความสามารถของ แอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลต F17, KC11 และ KT01 ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลต KT01 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 11.69 ± 0.06 ถึง 87.46 ± 0.07 (Table 3) และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต KC11 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ATCC 27853 ได้ 19.32 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 15.93 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* TISTR 687 และ *E. coli* ATCC 25922 และไอโซเลต F17 ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้เลยเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Leetanasaksakul and Thamchaipenet (2018) รายงานว่า ส่วนใสปราศจากเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียช่วยลดการสร้างไบโอฟิล์มของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลต่อไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* โดยการยับยั้งไบโอฟิล์มนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในน้ำเลี้ยงเซลล์ Park *et al.* (2012) ได้ทดสอบกิจกรรมการต้านไบโอฟิล์มจากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 458 ไอโซเลต พบว่า 77 ไอโซเลตให้ผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าแอคติโนแบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Shewanella putrefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Vibrio harveyi*, *Candida albicans* และ

Methicillin-resistant *S. aureus* (Miller *et al.*, 2022; Nirwati *et al.*, 2022; Pusparajah *et al.*, 2021; You *et al.*, 2007)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไอโซเลต F17 สร้างสปอร์สีเทา เส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่สร้างรงควัตถุ ในขณะที่ไอโซเลต KC11 และ KT01 ซึ่งแยกจากคนละแหล่งตัวอย่าง มีลักษณะโคโลนีคล้ายกัน คือ สร้างสปอร์สีเทา สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองและไม่สร้างรงควัตถุ (Figure 3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. (Table 4, Figure 4) ไอโซเลต F17 (1,495 คู่เบส) และ KC11 (1,497 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *S. rochei* NRRL B-2410^T เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *S. mutabilis* NBRC 12800^T เท่ากับ 99.72 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต KT01 (1,499 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *S. griseoincarnatus* LMG 19316^T และ *S. labedae* NBRC 15864^T เท่ากันที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการแยกเชื้อ *S. rochei* และ *S. griseoincarnatus* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Arifiyanto *et al.* (2020) แยก *S. rochei* strain MN394821 จากดินประเทศอินโดนีเซีย เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวและยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 6538P ส่วน Kanini *et al.* (2013) ทำการแยก *S. rochei* ACTA1551 จากดินรอบรากสน (*Pinus brutia*) พบว่า เชื้อดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *S. griseorubiginosus* No.4915 ที่แยกจากดิน ประเทศฝรั่งเศส ผลิตยาปฏิชีวนะ cinerubins A และ B (David *et al.*, 1980) และ *S. griseoincarnatus* strain HK12 ที่แยกจากฟองน้ำทะเลสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ (Kamarudheen and Rao, 2019) ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียสกุล

Streptomyces sp. พบได้แพร่หลายทั่วไปในดิน (Williams *et al.*, 1983) และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของสารออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียที่เหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ ผลิตจากกลุ่ม non-*Streptomyces* (Bérdy, 2012)

Table 3 Antibiofilm activities of cell-free supernatant of actinobacteria against pathogenic bacteria

Isolation code	Percentage of biofilm inhibition			
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>S. aureus</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i>
F17	-	-	-	-
KC11	-	15.93 ± 0.08	-	19.83 ± 0.06
KT01	11.69 ± 0.06	19.32 ± 0.05	23.57 ± 0.37	87.46 ± 0.07

Note : - no inhibition

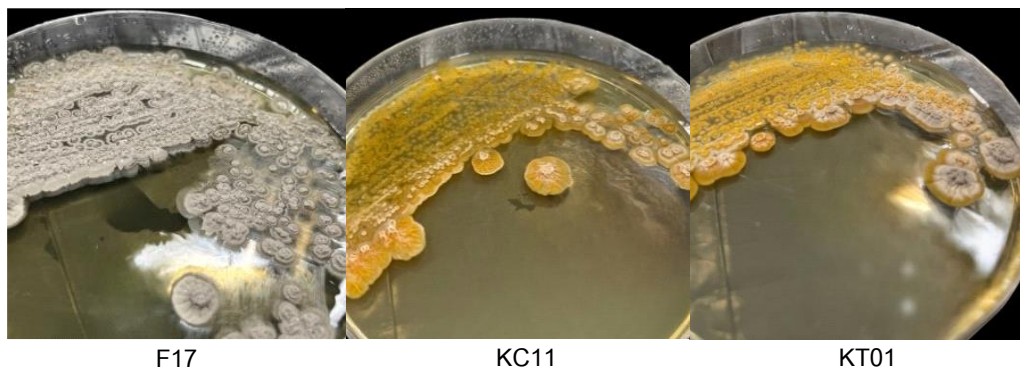


Figure 3 Colony morphology of active actinobacterial isolates F17, KC11 and KT01 grown on ISP2 for 7 days at 28 °C

Table 4 Nucleotide sequence alignment analysis of 16S rRNA gene of isolates

Isolation code	Accession numbers	Most closely related type strain	% Similarity
F17	OQ612715	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T (MUMD01000370)	100.0
KC11	OQ612716	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T (MUMD01000370)	100.0
KT01	OQ612717	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316 ^T (AJ781321)	100.0

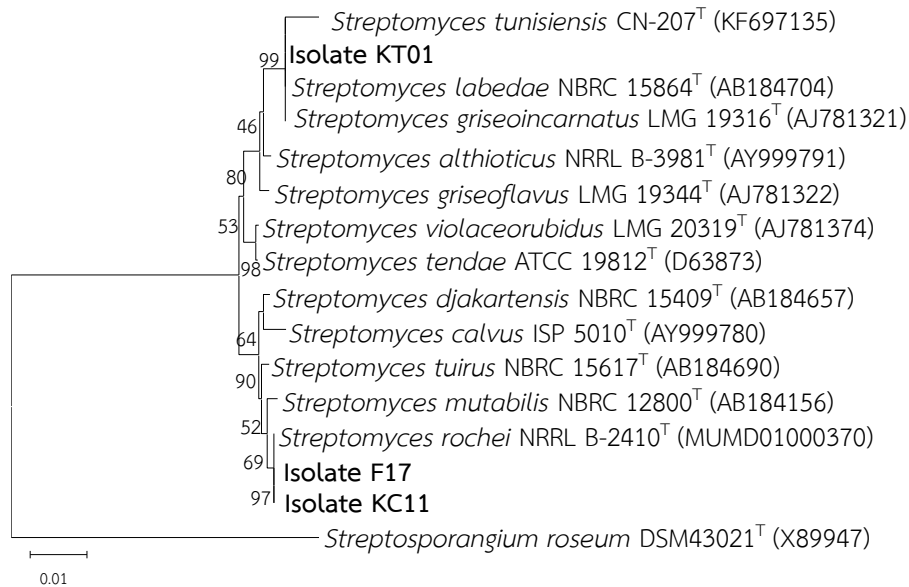


Figure 4 Phylogeny trees constructed using the Neighbor-joining tree method based on 16S rDNA sequencing showing the phylogenetic relationships of isolates KT01, F17 and KC11 and related taxa. Bootstrap percentages (based on 1000 replicates) are shown if greater than 50%.

สรุป

แอสคิตินแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบราก ฟ้าทะลายโจร จำนวน 17 ไอโซเลต ดินรอบราก กัญชา จำนวน 11 ไอโซเลต และดินรอบรากกระท่อม จำนวน 12 ไอโซเลต นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี perpendicular พบว่ามีจำนวน 11 ไอโซเลต ที่ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลต คือ F17, KC11, KT01 ซึ่งแยกจากดินรอบรากฟ้าทะลายโจร ดินรอบรากกัญชา และดินรอบรากกระท่อม ตามลำดับ มีสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด เมื่อนำทั้ง 3 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าไอโซเลต KT01 ให้ผลการยับยั้งไบโอฟิล์มดีที่สุด น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลต KT01 มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* สูงถึง 87.46 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ 23.57 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์ จากการลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่า ไอโซเลต

KT01 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316^T 100 เปอร์เซ็นต์ ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดินรอบรากพืชฟ้าทะลายโจร กระท่อม และกัญชา เป็นแหล่งของแอสคิตินแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จรัส แก้วแรมเรือน อาจารย์ประจำสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียทดสอบ ขอขอบคุณหน่วยงานชั้นสูงตรังค์สตร์ กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง Microplate Reader งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนพัฒนานิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปีการศึกษา 2565

เอกสารอ้างอิง

- Arifiyanto, A., Surtiningsih, T., Ni'matuzahroh, Fatimah, Agustina, D. & Alami, N.H. (2020). Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101513. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101513.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58, 1–26. doi: 10.1038/ja.2005.1.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385–395. doi: 10.1038/ja.2012.27.
- Castronovo, L.M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., Fani, R., & Maggini, V. (2021). Medicinal plants and their bacterial microbiota: a review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens*, 10(2), 106. doi: 10.3390/pathogens10020106.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- David, L., Duteurtre, M., Kergomard, A., Kergomard, G., Scanzi, E. & Staron, T. (1980). Production of cinerubins by a *Streptomyces griseorubiginosus* strain. *The Journal of Antibiotics*, 33(1), 49–53.
- Flemming, H.C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Review*, 8, 623–633
- Goel, N., Fatima, S. W., Kumar, S., Sinha, R. & Khare, S. K. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*, 30, e00613. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00613.
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y. & Panbangred, W. (2011). Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes*, 4(98). doi: 10.1186/1756-0500-4-98.
- Janatiningrum, I. & Lestari, Y. (2022). Enzyme production, antibacterial and antifungal activities of actinobacteria isolated from *Ficus deltoidea* rhizosphere. *Biodiversitas*, 23(4), 1950–1957.
- Jose, P.A., Maharshi, A. & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, 126708. doi: 10.1016/j.micres.2021.126708.
- Kamarudheen, N. & Rao, K.V.B. (2019). Fatty acyl compounds from marine *Streptomyces griseoincarnatus* strain HK12 against two major bio-film forming nosocomial pathogens; an *in vitro* and *in silico* approach. *Microbial pathogenesis*, 127, 121–130.

- Kanini, G.S., Katsifas, E.A., Savvides, A.L., & Karagouni, A.D. (2013). *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *BioMed Research International*, 2013, 387230. doi: 10.1155/2013/387230.
- 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.
- Khamna, S., Yokota, A. & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 649–655.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalđe, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J. & Vuković-Gačić, B. (2016). Optimization of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Botanica Serbica*, 1(140), 29–36.
- Kumari, N., Menghani, E. & Mithal, R. (2019). Bioactive compounds characterization and antibacterial potentials of actinomycetes isolated from rhizosphere soil. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 78, 793–798.
- Küster, E. & Williams, S.T. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, 202, 928–929.
- Leetanasaksakul, K. & Thamchaipenet, A. (2018). Potential anti-biofilm producing marine actinomycetes isolated from sea sediments in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 52, 228–233.
- Li, F., Liu, S., Lu, Q., Zheng, H., Osterman, I. A., Lukyanov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Liu, S., Ye, J., Huang, D., & Sun, C. (2019). Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in Futian and Maowehai of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 3476567. doi: 10.1155/2019/3476567.
- Li, N., Xu, D., Huang, R.-H., Zheng, J.-Y., Liu, Y.-Y., Hu, B.-S., Gu, Y.-Q. & Du, Q. (2022). A new source of diterpene lactones from *Andrographis paniculata* (Burm. f.) nees- Two endophytic fungi of *Colletotrichum* sp. with antibacterial and antioxidant activities. *Frontiers in Microbiology*, 13, 819770. doi: 10.3389/fmicb.2022.819770.
- Limoli, D.H., Jones, C.J. & Wozniak, D.J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- Michaelis, C. & Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2), 328. doi: 10.3390/antibiotics12020328.

- Miller, T., Waturangi, D.E. & Yogiara. (2022). Antibiofilm properties of bioactive compounds from *Actinomycetes* against foodborne and fish pathogens. *Scientific Reports*, 12, 18614. doi:10.1038/s41598-022-23455-8.
- Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(11), 1831–1836.
- Nirwati, H., Damayanti, E., Sholikhah, E.N., Mutofa, M. & Widada, J. (2022). Soil-derived *Streptomyces* sp. GMR22 producing antibiofilm activity against *Candida albicans*: Bioassay, untargeted LC-HRMS, and gene cluster analysis. *Heliyon*, 8(4), e09333. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09333.
- O'Toole, G.A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 30(47), 2437. doi: 10.3791/2437.
- Park, J.-H., Lee, J.-H., Kim, C.-J., Lee, J.C., Cho, M.H. & Lee, J. (2012). Extracellular protease in *Actinomycetes* culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Biotechnology letters*, 34, 655–661.
- Prawatviteesuk, A., Supan, W., Sombood, P., Vorasanon, K. & Vichitvejpaisal, P. (2022). Cannabis, Kratom and Kariyat: issues of concern in perianesthetic care. *Siriraj Medical Bulletin*, 15(4), 266–274.
- Pusparajah, P., Letchumanan, V., Law, J.W.-F., Ab Mutalib, N. S., Ong, Y.-S., Goh, B.-H., Tan, L.T.-H & Lee, L.-H. (2021). *Streptomyces* sp.-A treasure trove of weapons to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm associated with biomedical devices. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9360. doi: 10.3390/ijms22179360.
- Rakphet, K., Vasapong, S. & Thanusin, W. (2022). The cultivation, traditional uses and pharmacological activities of “Fah talai jone” (*Andrographis paniculata*): A medicinal plant in Thai and Chinese traditional medicine. *Thailand Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1(1), 136–148.
- Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M.S., El-Beltagi, H.S., Umar, S. & Lee, J. (2022). Bioprospecting plant growth promoting rhizobacteria for enhancing the biological properties and phytochemical composition of medicinally important crops. *Molecules*, 27(4), 1407. doi: 10.3390/molecules27041407.
- 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.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Method for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Bacteriology*, 16, 313–340.

- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K.B. & Rajnish, K.N. (2021). Bacterial exopolysaccharides in biofilms: Role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1–19.
- Také, A., Matsumoto, A., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2015). *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. *The Journal of Antibiotics*, 68, 322–327.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11, *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Vaghela, N. & Gohel, S. (2023). Medicinal plant-associated rhizobacteria enhance the production of pharmaceutically important bioactive compounds under abiotic stress conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 63, 308–325.
- Verderosa, A.D., Totsika, M. & Fairfull-Smith, K.E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Frontiers in chemistry*, 7, 824. doi: 10.3389/fchem.2019.00824.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, E.M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P. H. A., Sackin, M.J. & Mortimer, A.M. (1983). A probability matrix for identification of some streptomycetes. *Microbiology*, 129(6), 1815–1830.
- Wang, Y., Jiao, P., Guo, W., Du, D., Hu, Y., Tan, X. & Liu, X. (2022). Changes in bulk and rhizosphere soil microbial diversity and composition along an age gradient of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantations in subtropical China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 777862. doi: 10.3389/fmicb.2021.777862.
- 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.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L. & Zhou, S. (2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied microbiology and biotechnology*, 76, 1137–1144.