



ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ด้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้
จากดินบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

วงศ์กร พงศ์โสภิตานันท์

ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยรามคำแหง

ปีงบประมาณ 2561

**DIVERSITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ACTINOBACTERIA ISOLATED
FROM SOIL OF SICHANG ISLAND, CHONBURI PROVINCE**

WONGSAKORN PHONGSOPITANUN

**RESEARCH FUND WAS SUPPORTED BY
RAMKHAMHAENG UNIVERSITY 2018**

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่องวิจัย	ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
ผู้วิจัย	ดร. วรศกร พงศ์โสภิตานันท์
ปีที่ทำวิจัย	2561-2562

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เพื่อคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์ใหม่และคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพจากการศึกษาสามารถคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียได้จำนวน 55 ไอโซเลต เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene สามารถจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ออกเป็นสองสกุลคือ *Nocardia* จำนวน 23 ไอโซเลต และ *Streptomyces* จำนวน 32 ไอโซเลต และพบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่มีแนวโน้มที่จะเป็นสายพันธุ์ใหม่จำนวน 2 ไอโซเลตคือ SC052 และ SC095 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia xestospongiae* ST01-07^T และ *Streptomyces viridosporus* NRRL 2414^T ที่ 97.8 และ 98.3 ตามลำดับ จากการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า *Streptomyces* จำนวน 22 ไอโซเลตแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบและพบว่าไอโซเลต SC095 ซึ่งคาดว่าเป็นแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ยังแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากแหล่งที่ไม่เคยมีการคัดแยกมาก่อนสามารถเพิ่มโอกาสในการค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อยอดได้

Abstract

Research Title	Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from soil of Sichang island, Chonburi Province
Research Scholar	Dr. Wongsakorn Phongsopitanun
Research Period	2018-2018

The aim of this study is to isolate the actinobacteria from soil samples collected from Sichang island, Chonburi Province for screening the novel actinobacterial species and antimicrobial activities of the isolates. In this study, 55 actinobacteria were isolated. On the basis of morphological characteristics and 16S rRNA gene analysis, they were identified into two genera including *Nocardia* (23 isolates) and *Streptomyces* (32 isolates). Interestingly, isolate SC052 and SC095, closely related to *Nocardia xestospongiae* ST01-07^T and *Streptomyces viridosporus* NRRL 2414^T with 97.8% and 98.3% similarity respectively, represented the candidate of novel species status. Based on preliminary antimicrobial screening, 22 *Streptomyces* isolates exhibited antimicrobial activity against tested microorganism. Furthermore, SC095, the candidate of novel *Streptomyces* species, showed activities against Gram-positive bacteria. This study represents that if we isolate the microbe from new habitat, it will lead to discover of the novel microbe which can be used for further studies.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยรามคำแหง ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรของสถาบันฯ สำหรับแหล่งทุนในการทำวิจัย การอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำในการดำเนินการขอทุนสนับสนุนวิจัย นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากหลายหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ อาจารย์ ดร. ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยสนับสนุนเครื่องมือและสารเคมีที่นอกเหนือจากที่แหล่งทุนสนับสนุน ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมศักดิ์ ยี่มิน และ อาจารย์ ดร. มาฆมาส สุทธาชีพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในการสนับสนุนอุปกรณ์และพื้นที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ คุณสุวณี ทองเฉลิม สำหรับความไว้วางใจในการลงนามทำสัญญาค้ำประกันยืมเงินสำหรับทำวิจัยจนงานสำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดร. วงศกร พงศ์โสภิตานันท์

หัวหน้าโครงการ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญภาคผนวก	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 อนุกรมวิธานของแอสคิโนแบคทีเรีย	2
2.2 การคัดแยกและความหลากหลายทางชีวภาพของแอสคิโนแบคทีเรีย	5
2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากแอสคิโนแบคทีเรีย	7
2.4 ตำแหน่งที่ตั้งและภูมิประเทศของเกาะสีชัง	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 เก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอสคิโนแบคทีเรีย	11
3.2 การจำแนกแอสคิโนแบคทีเรีย	11
3.3 การคัดกรองแอสคิโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ	12
3.4 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอสคิโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	12
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบของแอสคิโนแบคทีเรียที่คัดเลือก	12
3.6 การเก็บรักษาสายพันธุ์แอสคิโนแบคทีเรีย	13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	
4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกแอสคิโนแบคทีเรีย	14
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแอสคิโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	14
4.3 การระบุชนิดของแอสคิโนแบคทีเรียโดยใช้ยีนบริเวณ 16S rRNA	18
4.4 แอสคิโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็สายพันธุ์ใหม่	22
4.5 การคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของแอสคิโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	26
4.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบของแอสคิโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่	29
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัย	31
ภาคผนวก	32
เอกสารอ้างอิง	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 เคโมไทป์ของผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย	4
ตารางที่ 2.2 รูปแบบของน้ำตาลภายในเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียที่มี meso-diaminopimelic acid	4
ตารางที่ 2.3 ชนิดของฟอสโฟลิปิดของแอคติโนแบคทีเรีย	4
ตารางที่ 2.4 selective media ที่ใช้ในการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างในธรรมชาติ	6
ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้ในประเทศไทย	7
ตารางที่ 2.6 จำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คัดแยกได้จากแอคติโนแบคทีเรียจำแนกตามสกุล	8
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย	9
ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งของตัวอย่างดินในเกาะสีชังจังหวัดชลบุรีที่ถูกเก็บมาศึกษา	14
ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ บนอาหาร ISP2 agar	15
ตารางที่ 4.3 ผล BLASTn search ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	19
ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	26
ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด	29

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 วงชีวิตโดยทั่วไปของแอกติโนแบคทีเรียสกุล <i>Streptomyces</i>	2
รูปที่ 2.2 รูปวาดสปอร์ของแอกติโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ	3
รูปที่ 4.1 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรีกับตัวแทนของสกุลในไฟลัมแอกติโนแบคทีเรีย	21
รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะป็นสายพันธุ์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และสังเกต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า	23
รูปที่ 4.3 neighbour joining tree จาก <i>gyrB</i> gene ของไอโซเลต SC052 กับสมาชิกทั้งหมด ของสกุล <i>Nocardia</i> และใช้ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC 27294T เป็น outgroup	24
รูปที่ 4.4 neighbour joining tree จาก 16S rRNA gene ของไอโซเลต SC095 กับสมาชิกที่มี ความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene สูงที่สุดกับสมาชิกของวงศ์ <i>Streptomycetaceae</i> <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> IFO 14455 ^T ถูกใช้เป็น out group	25
รูปที่ 4.5 ตัวอย่างจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ก) แอกติโนแบคทีเรียใน ภาพมี ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ <i>B. subtilis</i> <i>K. rhizophila</i> และ <i>S. aureus</i> จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสามชนิดไม่สามารถเจริญเข้าใกล้บริเวณที่มีรอย ขีดของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (ข) แสดงตัวอย่างแอกติโนแบคทีเรียที่ไม่ สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการ ทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญเข้าใกล้กับรอยขีดของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียได้	28
รูปที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อดิสก์	30
รูปที่ 4.7 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 เมื่อ เลี้ยงในอาหาร ISP2 (ก) 54 (ข) และ 301 medium (ค) เมื่อใช้ ethylacetate : Hexane 1:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้แสง UV ที่ 254 นาโนเมตร ในการตรวจสอบ (ง) Bioautography ของสารสกัดหยาบจากอาหาร 301 medium ต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i> แสดงให้เห็นโซนยับยั้งบริเวณ Rf = 0.07	30

สารบัญภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

หน้า
32

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันแม้ว่าการพัฒนาทางการแพทย์และเภสัชกรรมจะมีความก้าวหน้ามาก อย่างไรก็ตามจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้องและฟุ่มเฟือยในปัจจุบันทั้งในการรักษามนุษย์และการทำปศุสัตว์ ทำให้ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Acinetobacter baumannii* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ปัญหาเชื้อดื้อยาส่งผลกระทบต่อภาพรวมของระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประเทศอย่างมากเนื่องจากผู้ป่วยต้องใช้ระยะเวลาและปริมาณยาในการรักษามากขึ้น การแก้ไขปัญหาคือการหาวิธีการจัดการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ให้เหมาะสมแล้วนั้น อีกวิธีหนึ่งที่เป็นแนวทางแก้ปัญหาคือการหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่

แอกติโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีนและไซโตซีนในจีโนมสูงกว่า 55 mol% และเป็นที่รู้จักดีในฐานะผู้ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ในทางเภสัชกรรมยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันหลายชนิดล้วนมาจากแอกติโนแบคทีเรียทั้งสิ้น เช่น avermectin actinomycin amphotericin B daptomycin erythromycin gentamycin kanamycin neomycin platensimycin rifamycin streptomycin tetracycline และ vancomycin เป็นต้น

แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถพบได้ในดินอย่างไรก็ตามการแยกเชื้อในบริเวณเดิมมักได้เชื้อสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและได้ทำการศึกษาสารเมแทบอไลต์อย่างดีแล้ว ดังนั้นเพื่อเพิ่มโอกาสการค้นพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างจากที่เคยค้นพบ งานวิจัยนี้จึงมีสมมติฐานคือ หากแยกแอกติโนแบคทีเรียจากเกาะที่ห่างไกลจากแผ่นดินและเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อนจะทำให้มีโอกาสพบเชื้อแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างกันไปจากเดิม และแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่นี้จะมีความเป็นไปได้ที่จะสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมที่เคยมีประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และนโยบายยุทธศาสตร์ Thailand 4.0 มีการให้ความสำคัญกับการใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และฐานชีวภาพเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจให้ยั่งยืน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณต่างๆ บนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายและคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียบนเกาะอย่างเป็นทางการเป็นรูปธรรม รวมถึงคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพเพื่อสร้างเป็นคลังวัตถุดิบชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนายาของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เพื่อใช้ในการวิจัยพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติรวมถึงยาปฏิชีวนะในโครงการอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

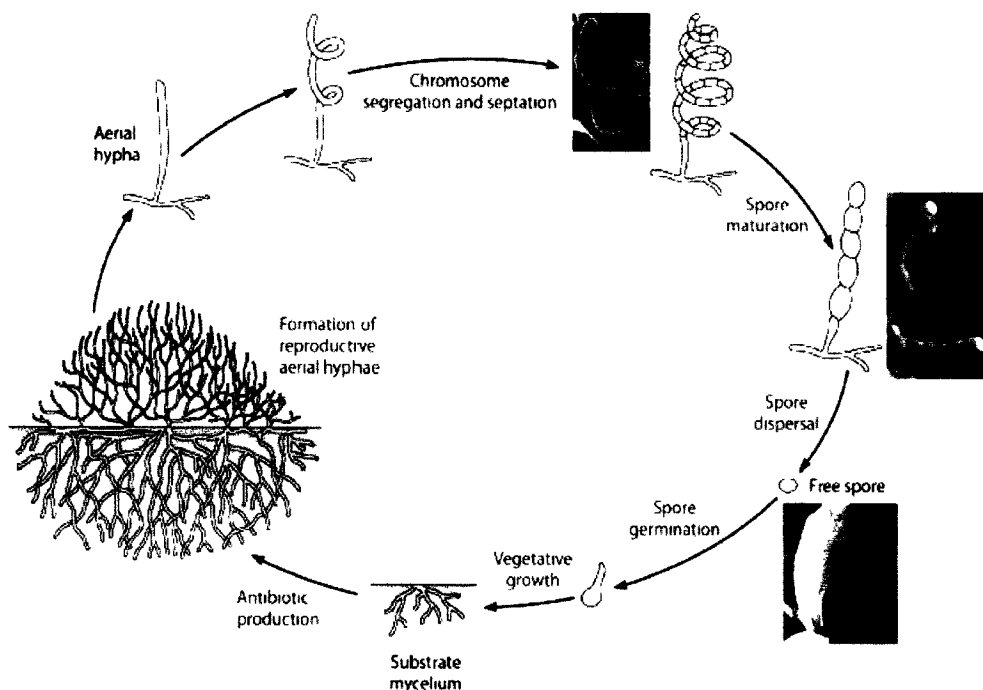
วัตถุประสงค์ (OBJECTIVES)

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนแบคทีเรียบนเกาะสีชัง
2. เพื่อคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพจากดินเกาะสีชัง
3. เพื่อสร้างคลังวัตถุดิบชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนายาของมหาวิทยาลัยรามคำแหง

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ฟิล์มแอคติโนแบคทีเรียเป็นฟิล์มของแบคทีเรียที่มีสมาชิกมากที่สุดในโดเมนแบคทีเรีย โดยทั่วไปคำว่า “แอคติโนแบคทีเรีย” มีความหมายคือ กลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีนและไซโตซีนในจีโนมสูงกว่า 55 mol% แอคติโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างเส้นใย (mycelium) ได้คล้ายเชื้อราอย่างไรก็ตาม แอคติโนแบคทีเรียไม่ได้ถูกจัดเป็นเชื้อราเนื่องจากเป็นโปรแคริโอติกเซลล์และมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเพปไทโดไกลแคนซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรีย ในปัจจุบันอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามหากยึดตาม Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Volume 5 แอคติโนแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 6 คลาส คือ *Actinobacteria*, *Acidimicrobia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* and *Thermoleophilia* โดยแบ่งเป็น 19 อันดับ 50 วงศ์ และ 221 สกุล (Ludwig et al., 2012)



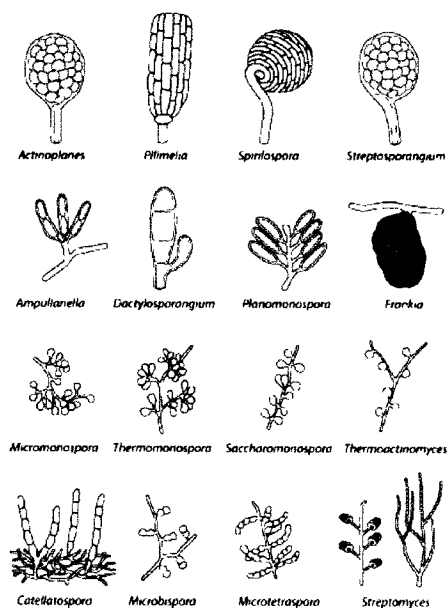
รูปที่ 2.1 วงชีวิตโดยทั่วไปของแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* (Barka, et al., 2016)

2.1 อนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย

การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรียในปัจจุบันใช้ระเบียบวิธีที่เรียกว่า “Polyphasic Taxonomy” ซึ่งมีความหมายคือการใช้หลากหลายระเบียบวิธีในการศึกษาอนุกรมวิธาน ได้แก่ การใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ อนุกรมวิธานทางเคมี ลักษณะทางจีโนไทป์ และการวิเคราะห์ลำดับทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ร่วมกันในการอธิบายแบคทีเรียชนิดหนึ่ง

ลักษณะทางฟีโนไทป์ คือลักษณะที่แสดงออกภายนอกที่สามารถสังเกตได้ด้วยประสาทสัมผัสทางตา ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่สำคัญในการศึกษาอนุกรมวิธานของแอกติโนแบคทีเรีย ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะ พื้นผิว ขนาดของสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์และตำแหน่งของสปอร์ เป็นต้น (รูปที่ 2.2) คุณลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เช่น การเจริญใน pH อุณหภูมิ ระดับความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างเอนไซม์ในระบบเมแทบอลิซึม และความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น และ ลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ในปี 1966 Shirling และ Gottlieb ได้ตีพิมพ์วิธีที่จะใช้ในการศึกษาแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ขึ้น เพื่อให้ศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์และนักวิจัยแอกติโนแบคทีเรียได้มีวิธีที่ใช้ในการศึกษาที่เหมือนกันเพื่อให้แต่ละห้องปฏิบัติการสามารถศึกษาซ้ำได้ โดยผลงานตีพิมพ์ดังกล่าวได้กลายมาเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแอกติโนแบคทีเรียในปัจจุบัน (Shirling & Gottlieb, 1966)

องค์ประกอบทางเคมีเป็นลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในระดับสกุล (genus) ลักษณะที่ใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานทางเคมีที่สำคัญของแอกติโนแบคทีเรีย ได้แก่ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมีโนพิมลิก (diaminopimelic acid) ของผนังเซลล์ การมีหรือไม่มีกรดไมโคลิก (mycolic acid) ที่ผนังเซลล์ ชนิดหมู่เอซิลของกรดมิวรามิก (acyl type of muramic acid) ชนิดของน้ำตาลที่พบในเซลล์ ชนิดของฟอสโฟลิปิด (phospholipids) และกรดไขมัน (fatty acids) ในปี 1970 Lechevalier ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแอกติโนแบคทีเรียและสามารถจัดจำแนกผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียตามไอโซเมอร์ของกรดไดอะมีโนพิมลิกและกรดอะมิโนของผนังเซลล์ได้เป็น 8 กลุ่ม (ตารางที่ 2.1) และสามารถแบ่งกลุ่มตามชนิดของน้ำตาลที่พบภายในเซลล์ได้เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 2.2) ต่อมาในปี 1977 Lechevalier ได้ศึกษาองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดในแอกติโนแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ และสามารถจัดกลุ่มของฟอสโฟลิปิดตามการมีและไม่มีอนุพันธ์ของฟอสฟาทีดิลเอทานอลามีนได้ 5 กลุ่ม (ตารางที่ 2.3)



รูปที่ 2.2 รูปร่างสปอร์ของแอกติโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Barka, et al., 2016)

ตารางที่ 2.1 เคมีไทป์ของผนังเซลล์แอกติโนแบคทีเรีย (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

Cell wall type	DAP*	lysine	ornithine	aspartic acid	glycine	meso-DAP	LL-DAP	arabinose	galactose
I	-	-	-	-	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	+	+	-	-	-
III	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-	+	+
V	-	+	+	-	*	-	-	-	-
VI	-	+	-	+	*	-	-	-	-
VII	+	+	-	+	*	-	-	-	-
VIII	-	-	-	+	*	-	-	-	-

*, กลุ่มนี้อาจจะมีหรือไม่มี glycine; **, อาจพบ hydroxyl DAP; +, พบ -, ไม่พบ

ตารางที่ 2.2 รูปแบบของน้ำตาลภายในเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียที่มี meso-diaminopimelic acid (Lechevalier & Lechevalier, 1970)

ชนิด	น้ำตาลที่ใช้ระบุชนิด			
	arabinose	galactose	madurose	xylose
A	+	+	-	-
B	-	-	+	-
C	-	-	-	-
D	+	-	-	+

ตารางที่ 2.3 ชนิดของฟอสโฟลิปิดของแอกติโนแบคทีเรีย (Lechevalier et al., 1977)

Phospholipid type	Polar lipid							
	PIMs	Pi	PC	PG	PE	PME	GluNu	DPG
PI	+	+	-	v	-	-	-	v
PII	+	+	-	v	+	-	-	+
PIII	v	+	+	v	v	+	-	v
PIV	ND	+	-	-	v	v	+	+
PV	ND	+	-	v	v	-	+	+

หมายเหตุ: PIMs, phosphatidyl inositol mannosides; PI, phosphatidyl inositol; PC, phosphatidyl choline; PE, phosphatidyl ethanolamine; PME, phosphatidyl methyl ethanolamine; GluNu, glucosamine containing unknown phospholipids; DPG, diphosphatidyl glycerol; +, พบ; ND, ไม่มีข้อมูล; v, ไม่แน่นอน; -, ไม่พบ

ลักษณะทางจีโนมโทป์ หมายถึง ลักษณะองค์ประกอบของยีนของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศมีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว การศึกษาอนุกรมวิธานและการจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียในปัจจุบันจึงสามารถทำได้รวดเร็วขึ้นโดยการวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16S rRNA โดยยีนดังกล่าวเป็นส่วนประกอบหนึ่งของชิ้นส่วนเล็ก (small subunit) ของไรโบโซมของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์สามารถทำได้ในระบบฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น www.ezbiocloud.net/ (Yoon et al., 2017) หรือ blast.ncbi.nlm.nih.gov เป็นต้น นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถทำได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ต่างๆ เช่น MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) เป็นต้น

2.2 การคัดแยกและความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนแบคทีเรียในประเทศไทย

แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถพบได้ในดิน ในธรรมชาติแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ดำรงชีพแบบแซปโรไฟติก (saprophytic) โดยมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์หลายชนิดในดิน โดยทั่วไปดิน 1 กรัมจะมีแอกติโนแบคทีเรียประมาณ 10^6 ถึง 10^9 เซลล์ แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในดินร้อยละ 95 เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* ในปัจจุบันมีการรายงานว่ายีนแอกติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น รากพืช แมลง ฟองน้ำทะเล และสัตว์ทะเลหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตะกอนใต้ทะเล (marine sediment) ทะเลสาบ และในอากาศ ยังเป็นแหล่งที่อยู่ของแอกติโนแบคทีเรียเช่นกัน

แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ถูกศึกษามักเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินบนบก ปัญหาส่วนใหญ่ในปัจจุบันของการศึกษาแอกติโนแบคทีเรียคือการแยกได้เชื้อสายพันธุ์เดิมที่ซ้ำกับที่เคยมีรายงานมาก่อนและการแยกได้สารเมตาบอไลต์ที่เคยมีการศึกษามาก่อนแล้ว ซึ่งปัญหาดังกล่าวมักเกิดจากการแยกเชื้อจากแหล่งเดิมๆ ที่ซ้ำกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาการแยกเชื้อได้ซ้ำซ้อนกับที่เคยมีการค้นพบมาก่อนจึงมีแนวคิดที่จะแยกแอกติโนแบคทีเรียจากแหล่งที่อยู่อื่นๆ เช่น แอกติโนแบคทีเรียทางทะเล (marine actinomycetes) แอกติโนแบคทีเรียจากป่าพรุ (peat swamp forest actinobacteria) แอกติโนแบคทีเรียหายาก และ แอกติโนแบคทีเรียที่มีการอาศัยอยู่กับพืชและ/หรือไลเคน (endophytic actinobacteria) เป็นต้น

การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ในปัจจุบันใช้วิธี standard plating ซึ่งทำได้โดยการเตรียมสารละลายเชื้อจากแล้วกระจาย (spread) ลงบนอาหาร selective media ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียแกรมลบ (ตารางที่ 2.4) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมักทำให้ได้เชื้อในสกุล *Streptomyces* เป็นส่วนใหญ่ จึงมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการแยกเชื้อเพื่อให้ได้ความหลากหลายของเชื้อมากขึ้น เช่น การอบด้วยความร้อน การใช้สารเคมี การใช้เหยื่อล่อ การใช้แรงดันเหวี่ยง เป็นต้น

แม้ว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการแยกเชื้อจะมีหลากหลายวิธี อย่างไรก็ตามการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีอบตัวอย่างที่ 100 – 120 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดที่ช่วยในการแยกแอกติโนแบคทีเรียหายาก เนื่องจากความร้อนจะทำให้แบคทีเรียอื่นๆ ลดจำนวนลงแต่แอกติโนแบคทีเรียจะยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในรูปของสปอร์ นอกจากนี้ความร้อนยังช่วยกระตุ้นการงอกของสปอร์แอกติโนแบคทีเรียบางชนิดด้วย (Nonomura & Ohhara 1969)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่องจากตัวอย่างที่เก็บในประเทศไทย เช่น *Actinomadura rayongensis*, *A. syzygii*, *Asanoa endophytica*, *Dactylosporangium sucinum*, *Micromonospora fluostatini*, *M. humi*, *M. eburnean*, *M. siamensis*, *M. chaiyaphumensis*, *M. krabiensis*, *M. maritima*, *M. sediminicola*, *M. spongicola*, *Nocardia rayongensis*, *Nonomuraea syzygii*, *Phytohabitans kaempferiae*, *Sphaerisorangium rufum* *Streptomyces actinomycinicus*, *S. chumphonensis*, *S.*

stemonae, *S. siamensis*, *S. andamanensis*, *S. krungchingensis*, *S. oryzae* และ *Verrucousispora andamanensis* (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.4 Selective media ที่ใช้ในการคัดแยกแอสคิโนแบคทีเรียจากตัวอย่างในธรรมชาติ

ชื่ออาหาร	องค์ประกอบของอาหาร	เอกสารอ้างอิง
Arginine glycerol agar	Arginine monohydrochloride 1.0 g; glycerol 12.5 g; K ₂ HPO ₄ 1g; Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O, 0.010 g; NaCl 1.0 g; MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g; CuSO ₄ .5H ₂ O, 0.001 g; ZnSO ₄ .7H ₂ O, 0.001 g; MnSO ₄ H ₂ O, 0.001 g; and agar, 15.0 g; water 1 L	El-Nakeeb & Lechevalier et al., 1963
Carboxymethyl cellulose medium	1.0% carboxymethyl cellulose sodium salt, 0.1% L-asparagine, 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.0001% FeSO ₄ .7H ₂ O, 0.0001% MnCl ₂ .4H ₂ O, 0.0001% ZnSO ₄ .7H ₂ O, 1.5% agar, pH 7.0	Matsumoto & Takahashi, 2017
Humic acid vitamin agar	Humic acid 1.0 g*; Na ₂ HPO ₄ 0.5 g; MgSO ₄ .7H ₂ O 0.05 g; FeSO ₄ .7H ₂ O 0.01 g; CaCO ₃ 0.02 g B-vitamin**, agar 18 g; water 1 L	Hayakawa & Nonomura 1987
Starch casein nitrate agar	Glycerol (or starch) 10g; casein 0.3 g; KNO ₃ 2g; NaCl 2 g; K ₂ HPO ₄ 2 g; MgSO ₄ .7H ₂ O 0.05 g; CaCO ₃ 0.02 g; FeSO ₄ .7H ₂ O 0.01 g; Agar 18 g; distilled water 1 L, pH 7.0-7.2	Küster & Williams, 1964
Water proline agar	1.0% proline, 1.5% agar, tap water, pH not adjusted	Matsumoto & Takahashi, 2017

หมายเหตุ: Selective media สำหรับแอสคิโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีการเติมยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียแกรมลบ ยาต้านราที่นิยมใช้ในการคัดแยกแอสคิโนแบคทีเรีย คือ cycloheximide (50-100 mg/l) nystatin (25-50 mg/l) หรือ amphotericin B (30-50 mg/l) สำหรับยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ novobiocin 25 mg/l หรือ nalidixic acid 10-25 mg/l.

*ละลายใน 10 ml ของ 0.2 N NaOH

** ประกอบด้วย 0.5 mg ของ thiamine-HCl riboflavin niacin pyridoxin-HCl inositol Ca-pantothenate และ paminobenzoic acid และ 0.25 mg ของ biotin โดยใช้การกรองเพื่อทำให้วิตามินปลอดเชื้อ

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้ในประเทศไทย

สปีชีส์ของแอคติโนแบคทีเรีย	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ	เอกสารอ้างอิง
<i>Actinomadura rayongensis</i>	ดินป่าพรุ	Phongsopitanun et al., 2015 ^a
<i>Actinomadura syzygii</i>	<i>Syzygium cumini</i>	Rachniyom et al., 2015 ^a
<i>Asanoa endophytica</i>	<i>Boesenbergia rotunda</i>	Niemhom et al., 2016 ^a
<i>Dactylosporangium sucinum</i>	ดินป่าพรุ	Phongsopitanun et al., 2015 ^b
<i>Micromonospora eburnea</i>	ดินป่าพรุ	Thawai et al., 2005 ^a
<i>Micromonospora fluostatini</i>	ตะกอนใต้ทะเล	Phongsopitanun et al., 2015 ^c
<i>Micromonospora humi</i>	ดินป่าพรุ	Songsumanus et al., 2011
<i>Micromonospora siamensis</i>	ดินป่าพรุ	Thawai et al., 2005 ^b
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	ดิน	Jongrungruangchok et al., 2008 ^a
<i>Micromonospora krabiensis</i>	ดินใต้ทะเล	Jongrungruangchok et al., 2008 ^b
<i>Micromonospora maritima</i>	ดินป่าชายเลน	Songsumanus et al., 2013
<i>Micromonospora sediminicola</i>	ตะกอนใต้ทะเล	Supong et al., 2013 ^a
<i>Micromonospora spongicola</i>	ฟองน้ำทะเล	Supong et al., 2013 ^b
<i>Nocardia rayongensis</i>	ดินป่าพรุ	Tanasupawat et al., 2016 ^b
<i>Nonomurea syzygii</i>	<i>Syzygium cumini</i>	Rachniyom et al., 2015 ^b
<i>Phytohabitans kaempferiae</i>	<i>Kaempferia larsenii</i>	Niemhom et al., 2016 ^b
<i>Sphaerisorangium rufum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mingma et al., 2014
<i>Streptomyces actinomycinicus</i>	ดินป่าพรุ	Tanasupawat et al., 2016 ^a
<i>Streptomyces andamanensis</i>	ดิน	Sripreechasak et al., 2016
<i>Streptomyces chumphonensis</i>	ตะกอนดินใต้ทะเล	Phongsopitanun et al., 2014
<i>Streptomyces krungchingensis</i>	ดิน	Sripreechasak et al., 2017
<i>Streptomyces oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mingma et al., 2015
<i>Streptomyces siamensis</i>	ดิน	Sripreechasak et al., 2013
<i>Streptomyces similanensis</i>	ดิน	Sripreechasak et al., 2013
<i>Verrucospora andamanensis</i>	ฟองน้ำทะเล	Supong et al., 2013 ^c

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียเป็นที่รู้จักในฐานะผู้ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ในทางเภสัชกรรมพบว่ายาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันหลายชนิดล้วนมาจากแอคติโนแบคทีเรีย เช่น avermectin actinomycin amphotericin B daptomycin erythromycin gentamycin kanamycin neomycin platensimycin rifamycin streptomycin tetracycline และ vancomycin เป็นต้น ในปี 2005 Janos Berdy ได้รวบรวมข้อมูลสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ ณ เวลานั้นมีอยู่ 22,500 ชนิด โดย 10,100 ชนิดแยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย และจำนวนนี้พบว่า 7,630 ชนิดมาจากแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* เพียงสกุลเดียว (ตารางที่ 2.6) ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียได้แสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 จำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คัดแยกได้จากแอคติโนแบคทีเรียจำแนกตามสกุล (Berdy, 2005)

Family Streptomycetaceae:		Family Thermomonosporaceae:	
<i>Streptomyces</i>	8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
		<i>Actinosynnema</i>	51
Family Micromonosporaceae:		<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
<i>Ampullariella</i>	9	<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Glycomyces</i>	2		
<i>Catenuloplanes</i>	3	Family Mycobacteriaceae:	
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Nocardia</i>	357
		<i>Mycobacterium</i>	57
Family Pseudonocardiaceae:		<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Amycolatopsis/Nocardia</i>	120/357	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Pseudonocardia</i>	27		
<i>Amycolatopsis</i>	12	Other species:	
Streptosporangiaceae:		<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Microelllobosporia</i>	11
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Frankia</i>	7
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Westerdykella</i>	6
<i>Planobispora</i>	10	<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Synnenomyces</i>	4
		<i>Sebekia</i>	3
		<i>Elaktomyces</i>	3
		<i>Excelsospora</i>	3
		<i>Waksmania</i>	3

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย (ดัดแปลงจาก Barka et al., 2016)

กลุ่มของสารออกฤทธิ์/สายพันธุ์ที่ผลิต	ชื่อสารออกฤทธิ์	กลุ่มของสารออกฤทธิ์/สายพันธุ์ที่ผลิต	ชื่อสารออกฤทธิ์
กลุ่มสายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านแบคทีเรีย		กลุ่มสายพันธุ์ผลิตสารต้านรา	
<i>Verrucosisspora</i> spp.	Abyssomycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotercin B
<i>Streptomyces anulatus</i>	Actinomycins	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidin
<i>Streptomyces canus</i>	Amphomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Candididin
<i>Micromonospora</i> spp	Anthracycline	<i>Streptomyces</i> spp.	Carboxamycin
<i>Streptomyces canus</i>	Aspartocins	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol
<i>Streptomyces avermectilis</i>	Avermectin	<i>Streptomyces padanus</i>	Fungichromin
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	<i>Streptomyces galbus</i>	Galbonolides
<i>Micromonospora</i> spp.	Clostrimicins	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Guanidylfungin
<i>Streptomyces griseus</i>	Cycloheximide	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Jadomycin
<i>Streptomyces orchidaceus</i>	Cycloserine	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Kasugamycin
<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomycin	<i>Streptomyces</i> spp	Kitamycin
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin	<i>Streptomyces natalensis</i>	Natamycin
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamicin	<i>Streptomyces tendae</i>	Nikkomycin
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Hygromycin	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Oligomycin
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin	<i>Streptomyces humidus</i>	Phenylacetate
<i>Streptomyces kitasensis</i>	Leucomycin	<i>Streptomyces cacaoi</i>	Polyoxin B
<i>Streptomyces loncolnensis</i>	Lincomycin	<i>Streptomyces canus</i>	Resistomycin
<i>Marinispora</i> spp	Marinomycin	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Streptothricin
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycins	<i>Streptomyces canus</i>	Tetracenomycin
<i>Micromonospora</i> spp.	Netamicin	<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencin
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Validamycin
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	กลุ่มสายพันธุ์ผลิตสารต้านไวรัส	
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxytetracycline	<i>Streptomyces antibioticus</i>	9-β-D-arabinofuranosyladenine
<i>Streptomyces</i> spp.	Pristinamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Hygromycin
<i>Streptomyces lindensis</i>	Retamycin	<i>Streptomyces</i> spp.	Panosialins
<i>Streptomyces mediterranei</i>	Rifamycin	กลุ่มสายพันธุ์ผลิตสารกดภูมิคุ้มกัน	
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetin	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Brasilicardin
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiramycin	<i>Streptomyces filipinensis</i>	Hygromycin
<i>Streptomyces virginiae</i>	Staphylomycin		Pentalenolactone
<i>Streptomyces endus</i>	Stendomycin	กลุ่มสายพันธุ์ผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigin	<i>Nocardia rubra</i>	Rubratin
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Bestatin
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Streptothricin	<i>Kitasatospora kifunense</i>	FR-900494
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline	กลุ่มสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ทางการแพทย์	
<i>Micromonospora</i> spp.	Thiocoraline	<i>Streptomyces</i> spp.	L-Asparaginase
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	L-Glutaminase

สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของแอคติโนแบคทีเรียนอกจากการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่น เป็นยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลง และเป็นสารป้องกันโรคพืช เป็นต้น มีการรายงานว่า *Streptomyces aureus* S-34666 สามารถผลิตสารในกลุ่ม macrotetrolides ได้แก่ tetractin, dinactin และ trinactin ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยเฉพาะตัวไรของผลไม้และต้นชา (Ando et al., 1971; Misato, 1982) *Streptomyces hygroscopicus* สามารถผลิต validamycin A ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราใช้ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชผักสวนครัว (Kameda, 1987) *Streptomyces kasugaensis* สามารถผลิต kasugamycin มีฤทธิ์ต้านเชื้อราใช้ควบคุมเชื้อ *Pyricularia oryzae* ในข้าว (Umezawa, et al., 1965) *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis* สามารถผลิต polymyxins ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดที่ก่อโรคในผักและผลไม้ (Isono et al., 1965; Endo & Misato, 1969) นอกจากนี้สารในกลุ่ม macrotetrolides ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ยังสามารถใช้เป็นยาฆ่าแมลงและหนอนพยาธิหลายชนิด (Jizba et al, 1991)

2.4 ตำแหน่งที่ตั้งและภูมิประเทศของเกาะสีชัง

เกาะสีชัง เป็นอำเภอหนึ่งของจังหวัดชลบุรี มีพื้นที่ที่เป็นพื้นดินประมาณ 7.9 ตารางกิโลเมตร ตั้งอยู่ในอ่าวไทยนอกชายฝั่งอำเภอ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่พิกัดเส้นรุ้ง 13 องศา ถึง 12 องศาเหนือและระหว่างเส้นแวง 10 องศา 48 ลิปดา ถึง 100 องศา 51 ลิปดา มีเกาะบริวาร 8 เกาะคือ เกาะขามใหญ่ เกาะขามน้อย เกาะปรัง เกาะร้านดอกไม้ เกาะสั้บยื่น เกาะยายท้าว เกาะคางคาว และ เกาะท้ายตาหมื่น ภูมิประเทศส่วนใหญ่เป็นภูเขา โขดหิน และหาดทราย พื้นที่บนเกาะปกคลุมด้วยไม้พุ่มและไม้คลุมดิน และไม้ยืนต้นปะปนกันไป มีสภาพดินที่อุดมสมบูรณ์แต่มีความตื้นค่อนข้างมากเนื่องจากเกิดจากหินปูน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณต่างๆบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 7 ตัวอย่างรอบเกาะ นำตัวอย่างดินที่ได้มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างดินส่วนหนึ่งจะนำไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มโอกาสให้ได้กลุ่มแอกติโนแบคทีเรียหายาก วิธีการคัดแยกเชื้อทำโดยวิธี serial dilution method โดยใช้ humic acid vitamin agar จากนั้นบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วันแล้วคัดเลือกโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียไปทำให้เป็นบริสุทธิ์ต่อไป

3.2 การจำแนกแอกติโนแบคทีเรีย

แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จะถูกศึกษาลักษณะการเจริญพื้นฐานและลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร yeast-malt agar (ISP2) (Shirling & Gottlieb, 1966) โดยขีดเชืบบนอาหาร ISP2 จากนั้นบ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นบันทึกสีของเส้นใยอากาศ (aerial mycelia) สีของโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร (substrate mycelia) การสร้างสารสี (soluble pigment) และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CH model)

การเตรียม DNA ของแอกติโนแบคทีเรียเพื่อ การระบุสายพันธุ์โดย 16S rRNA gene sequence analysis ทำโดยเลี้ยงเซลล์แอกติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP2 broth จากนั้นเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเข็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวนสามครั้ง ในครั้งสุดท้ายเมื่อหน้าที่ใช้ล้างทิ้งแล้วให้เติม Tris-EDTA buffer (TE buffer) จำนวน 300 ไมโครลิตร และเติม aluminium oxide ที่ปราศจากเชื้อจำนวนเล็กน้อยแล้วปั่นเซลล์ให้แตกโดยใช้ micromixer (IEDA) เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นเติมสารละลาย phenol:chloroform (1:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอดไปมา 1 นาที จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบน ไปใส่หลอดเข็นทรีฟิวจหลอดใหม่ แล้วเติม sodium acetate 3M ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรส่วนใสที่ได้ และเติม ethanol ปริมาตรสองเท่าของสารละลายที่ดูดได้แล้วนำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที DNA ตกตะกอนจะติดอยู่ด้านล่างของหลอด ให้เทสารละลายทั้งหมดในหลอดทิ้งแล้วล้างหลอดด้วย ethanol (95% v/v) จำนวนสองครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งเมื่อแห้งดีแล้วให้เติมน้ำ 50 ไมโครลิตรเพื่อละลาย DNA จากนั้นเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rRNA ใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ universal primers คือ 20F (5'GAGTTTGATCCTGCTCA 3') และ 1500R (5'GTTACCTTGTTACGACTT 3') (Suriyachadkun et al., 2009) เมื่อได้ PCR product จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี capillary standard sanger sequencing (MACROGEN, Korea) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการระบุชนิด

ของแอดดีโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธี Basic Local Alignment Tool (BLAST) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Ezbiocloud (Yoon et al., 2017) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลตที่แยกได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016)

3.3 การคัดกรองแอดดีโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

แอดดีโนแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่แยกได้จะถูกคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นโดยวิธี co-cultivation โดยการฉีดเชื้อแอดดีโนแบคทีเรียบนด้านหนึ่งของจานอาหาร yeast-malt medium จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน แล้วฉีดเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ตั้งฉากกับแนวเชื้อแอดดีโนแบคทีเรียที่ฉีดไว้ บ่มจานเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ววัดบริเวณยับยั้ง แอดดีโนแบคทีเรียที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบหรือแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกที่ดีที่สุดจะถูกคัดเลือกมาส่งสารออกฤทธิ์ต่อไป

3.4 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอดดีโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แอดดีโนแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกจะถูกเลี้ยงใน production medium ได้แก่ ISP2 broth 54 broth และ 301 broth (ภาคผนวก ก) ที่สภาวะเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจะทำการสกัดสารเมแทบอไลต์ที่อยู่ในอาหารเหลวโดยใช้ ethyl acetate จากนั้นนำสารสกัดในชั้น ethyl acetate มาทำสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อไป

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบของแอดดีโนแบคทีเรียที่คัดเลือก

สารสกัดหยาบของเชื้อแอดดีโนแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกจะถูกนำมาทำสอบฤทธิ์โดยวิธี agar disc diffusion โดยมีวิธีการคือ

3.5.1 เตรียมเชื้อที่จะเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยแบคทีเรียนำมาเลี้ยงบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) และยีสต์เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl (w/v) แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับสารแขวนลอยมาตรฐาน McFarland no 0.5 จะได้สารแขวนลอยเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบ

3.5.2 เตรียมสารสกัดหยาบที่จะทดสอบความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายจำนวน 20 ไมโครลิตรบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วฝัง paper disc ให้แห้งก่อนนำไปทดสอบ และเนื่องจากการศึกษานี้เป็นการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นดังนั้นจึงไม่มีชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) แต่มีชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) เพื่อป้องกันผลบวกปลอม (false positive) โดยเตรียมชุดควบคุมเชิงลบโดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดหยาบหยดลงบนแผ่น paper disc ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปทดสอบพร้อมกับ paper disc ที่หยดด้วยสารสกัดหยาบ

3.5.3 นำไม้พินสำลีจุ่มในสารแขวนลอยเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ จากนั้นนำมาถูบนผิวหน้าของอาหารให้ทั่ว กรณีแบคทีเรียใช้อาหาร MHA และยีสต์ใช้อาหาร PDA จากนั้นนำแผ่น paper disc ที่จะทดสอบมาวางบนผิวหน้าอาหารแล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและรายงานในหน่วยมิลลิเมตร

3.6 การเก็บรักษาสายพันธุ์แอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและหรือมีแนวโน้มจะเป็นสายพันธุ์ใหม่จะทำการเก็บรักษาโดยวิธี lyophilization เพื่อให้มีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 10-15 ปี สำหรับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทั่วไปจะเก็บในรูปของสปอร์แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายกลีเซอรอล 10% (v/v) ทำหน้าที่ป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย

ดินจำนวน 7 ตัวอย่าง ได้ถูกเก็บในบริเวณต่างๆรอบเกาะสีชัง เมื่อวันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2560 สามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียได้จำนวน 55 ไอโซเลต โดยดินในเกาะสีชังมีความหนาแน่นของแอกติโนแบคทีเรียเฉลี่ย 66.1×10^4 CFU ต่อดินจำนวน 1 กรัม (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งของตัวอย่างดินในเกาะสีชังจังหวัดชลบุรีที่ถูกเก็บมาศึกษา

ตัวอย่าง	ชื่อสถานที่	ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์	จำนวนแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต)	ความหนาแน่นของแอกติโนแบคทีเรีย (CFU/g)
1	ยอดเขาพระจุลจอมเกล้า	13°10'15"N 100°48'17"E	13	102×10^4
2	ทางขึ้นยอดเขาพระจุลจอมเกล้า	13°10'10"N 100°48'16"E	6	55×10^4
3	ช่องเขาขาด	13°09'47"N 100°47'55"E	4	52×10^4
4	ทางไปแหลมจักรพงษ์	13°08'54"N 100°48'33"E	4	74×10^4
5	ถ้ำเขาพัง	13°08'5"N 100°48'02"E	15	70×10^4
6	ท่าขายทิม	13°07'37"N 100°48'37"E	7	54×10^4
7	จุดหาทุซราฐาน	13°08'46"N 100°48'58"E	6	56×10^4

วิเคราะห์บนอาหาร humic acid vitamin agar

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 55 ไอโซเลต ได้สรุปได้ในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 23 ไอโซเลต ได้แก่ SC138 SC139 SC142 SCXX SC001 SC008 SC025 SC033 SC053 SC109 SC122 SC141 SC152 SC155 SC164 SC178 SC179 SC180 SC058 SC049 SC055 SC052 และ SC009 มีการสร้างสายสปอร์เป็นสายสั้นบนเส้นใยอากาศและมีการแตกหักของเส้นใยอาหาร และกลุ่มที่ 2 จำนวน 32 ไอโซเลต ได้แก่ SC169 SC081 SC079 SC097 SC205 SC119 SC060 SC038 SC026 SC201 SC069 SC203 SC083 SC085 SC002 SC094 SC098 SC108 SC113 SC189 SC127 SC145 SC196 SC193 SC028 SC074 SC191 SC112 SC006 SC107 SC095 และ SC030 มีการสร้างสายสปอร์คล้ายสปริงบนเส้นใยอากาศและไม่พบการแตกหักของเส้นใยอาหาร (ตารางที่ 4.2)

จากข้อมูลสัณฐานวิทยาเบื้องต้นแอกติโนแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 มีลักษณะคล้ายคลึงกับสมาชิกของสกุล *Nocardia* และแอกติโนแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 มีลักษณะคล้ายคลึงกับสมาชิกของสกุล *Streptomyces*

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร ISP2 agar

Growth			Cultural characteristics*			Morphology
No.	Isolate no.	Aerial mycelia color	Colony color	Substrate mycelia color	Soluble pigment	
1	SC138	White	strong orange yellow	Strong orange yellow	-	Short aerial mycelia, the substrate mycelia fragmented into short elements
2	SC139	White	strong orange yellow	Strong orange yellow	-	
3	SC142	White	Brilliant yellow	Moderate greenish yellow	-	
4	SCXX	White	Brilliant yellow	Moderate greenish yellow	-	
5	SC001	Yellowish white	Yellowish white	Strong yellow	-	
6	SC008	Yellowish white	Yellowish white	Strong yellow	-	
7	SC025	Yellowish white	Yellowish white	Strong yellow	-	
8	SC033	Yellowish white	Yellowish white	Strong yellow	-	
9	SC053	White	Pale greenish yellow	Grayish greenish yellow	-	
10	SC109	Yellowish white	Yellowish white	Strong yellow	-	
11	SC122	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	
12	SC141	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	
13	SC152	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	
14	SC155	White	Moderate yellow	Moderate yellow	-	
15	SC164	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	
16	SC178	Yellowish white	Pale greenish yellow	Moderate orange yellow	-	
17	SC179	Yellowish white	Pale greenish yellow	Moderate orange yellow	-	
18	SC180	Yellowish white	Pale greenish yellow	Moderate orange yellow	-	
19	SC058	White	Pale orange yellow	Pale orange yellow	-	
20	SC049	White	Moderate yellow	Moderate yellow	-	
21	SC055	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	
22	SC052	Yellowish white	Yellowish white	Grayish yellow	-	
23	SC009	Yellowish white	Light orange yellow	Light orange yellow	-	

*สีจาก ISCC/NBS color chart system (Kelly, 1964)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสีของแอคติโนไมซีต์ที่แยกได้จากอาหาร ISP2 agar (ต่อ)

No.	Isolate no.	Growth		Cultural characteristics*				Morphology	
		Aerial mycelia color	Colony color	Substrate mycelia color	Soluble pigment				
24	SC169	Good	Light orange yellow	Deep yellowish brown	Deep yellowish brown	-			
25	SC081	Good	Bluish gray	Dark greenish yellow	Dark greenish yellow	-			
26	SC079	Good	Very pale blue	Dark olive green	Dark olive green	-			
27	SC097	Good	Light grayish greenish blue	Grayish green	Grayish green	-			
28	SC205	Good	Light greenish blue	Moderate greenish yellow	Strong greenish yellow	-			
29	SC119	Good	Medium gray	Dark greenish yellow	Moderate olive/ Dark greenish yellow	-			
30	SC060	Good	Light gray/ White	Dark greenish yellow	Dark greenish yellow	-			
31	SC038	Good	Light gray/White	Colorless	Pale yellow	-			
32	SC026	Good	Yellowish gray	Colorless	Grayish yellow	-			
33	SC201	Good	Brownish pink	Colorless	Dark grayish yellow	-			
34	SC069	Good	White/ Light greenish gray	Dark grayish yellow	Dark grayish yellow	-			
35	SC203	Good	Light gray	Colorless	Dark grayish yellow	-			
36	SC083	Good	White	Grayish brown	Grayish brown	-			
37	SC085	Good	Yellowish gray	Dark yellowish brown	Dark yellowish brown	-			
38	SC002	Good	Light grayish olive	Colorless	Light olive brown	-			
39	SC094	Good	Yellowish gray	Deep yellowish brown	Deep yellowish brown	-			
40	SC098	Good	Yellowish white	Grayish yellow	Grayish reddish yellow	-			
41	SC108	Good	Pale green	Moderate olive	Deep olive green	-			
42	SC113	Good	White/ Pale green	Moderate olive	Dark grayish olive	-			
43	SC189	Good	Greenish white	Light olive	Dark grayish yellow	-			
44	SC127	Good	White/ Light greenish gray	Moderate olive	Moderate olive	-			

*สีจาก ISCC/NBS color chart system (Kelly, 1964)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร ISP2 agar (ต่อ)

Growth		Cultural characteristics*			Morphology
No.	Isolate no.	Aerial mycelia color	Colony color	Substrate mycelia color	Soluble pigment
45	SC145	White	Moderate greenish yellow	Brownish orange/ grayish yellow	-
46	SC196	Greenish gray	Moderate greenish yellow	Light olive	-
47	SC193	Pale purple pink	Brownish orange	Brownish orange	-
48	SC028	Light gray	Grayish yellow	Grayish yellow	-
49	SC074	White/ Light gray	Colorless	Moderate greenish yellow	-
50	SC191	Medium gray	Grayish greenish yellow	Moderate yellowish green	-
51	SC112	Light greenish gray	Grayish yellow	Dark yellowish brown	-
52	SC006	Grayish white	White	White	-
53	SC107	Grayish green	Dark olive green	Dark olive green	-
54	SC095	White/ Light grayish greenish blue	Grayish yellow	Grayish yellow	-
55	SC030	Brownish black	Grayish yellow	Dark grayish yellow/Black	-

*สีจาก ISCC/NBS color chart system (Kelly, 1964)

4.3 การระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียโดยใช้ยีนบริเวณ 16S rRNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA ร่วมความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าสามารถจัดแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ

กลุ่มที่ 1 มีสมาชิกจำนวน 23 ไอโซเลต ได้แก่ SC138 SC139 SC142 SCXX SC001 SC008 SC025 SC033 SC053 SC109 SC122 SC141 SC152 SC155 SC164 SC178 SC179 SC180 SC058 SC049 SC055 SC052 และ SC009 มีความคล้ายคลึงกับสมาชิกของแอกติโนแบคทีเรียสกุล *Nocardia* ในกลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกับสกุล *Nocardia* นี้สามารถระบุชนิดได้เป็น 7 สปีชีส์ ได้แก่

1. *Nocardia amamiensis* จำนวน 4 ไอโซเลต คือ SC138 SC139 SC142 และ SCxx
2. *Nocardia bhagyanarayanae* จำนวน 14 ไอโซเลต คือ SC001 SC008 SC025 SC033 SC053 SC109 SC122 SC141 SC152 SC155 SC164 SC178 SC179 และ SC180
3. *Nocardia lijiangensis* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SC058
4. *Nocardia neocaledoniensis* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SC049
5. *Nocardia testacea* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SC055
6. *Nocardia xestospongiae* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SC052
7. *Nocardia xishanensis* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ SC009

กลุ่มที่ 2 มีสมาชิกจำนวน 32 ไอโซเลต ได้แก่ SC169 SC081 SC079 SC097 SC205 SC119 SC060 SC038 SC026 SC201 SC069 SC203 SC083 SC085 SC002 SC094 SC098 SC108 SC113 SC189 SC127 SC145 SC196 SC193 SC028 SC074 SC191 SC112 SC006 SC107 SC095 และ SC030 มีความคล้ายคลึงกับสมาชิกของสกุล *Streptomyces* สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถจำแนกได้เป็น 13 สปีชีส์ ได้แก่ *S. canaries* (1 ไอโซเลต), *S. capoamus* (1 ไอโซเลต), *S. coerulescens* (2 ไอโซเลต), *S. djakartensis* (1 ไอโซเลต), *S. enissocaesilis* (1 ไอโซเลต), *S. flavoviridis* (1 ไอโซเลต), *S. glaucescens* (1 ไอโซเลต), *S. globosus* (2 ไอโซเลต), *S. hawaiiensis* (1 ไอโซเลต), *S. iakyrus* (1 ไอโซเลต), *S. indiaensis* (2 ไอโซเลต), *S. leeuwenhoekii* (1 ไอโซเลต), *S. levis* (2 ไอโซเลต), *S. longispororuber* (2 ไอโซเลต), *S. luteogriseus* (1 ไอโซเลต), *S. neyagawaensis* (1 ไอโซเลต), *S. purpurascens* (1 ไอโซเลต), *S. rameus* (1 ไอโซเลต), *S. spinoverrucosus* (2 ไอโซเลต), *S. spiralis* (1 ไอโซเลต), *S. spongiae* (1 ไอโซเลต), *S. viridochromogenes* (1 ไอโซเลต), *S. viridosporus* (1 ไอโซเลต), *S. viridosporus* (1 ไอโซเลต) และ *S. yogyakartensis* (1 ไอโซเลต) ข้อมูลจาก BLASTn search ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากเกาะสีชังได้สรุปไว้ใน ตารางที่ 4.3

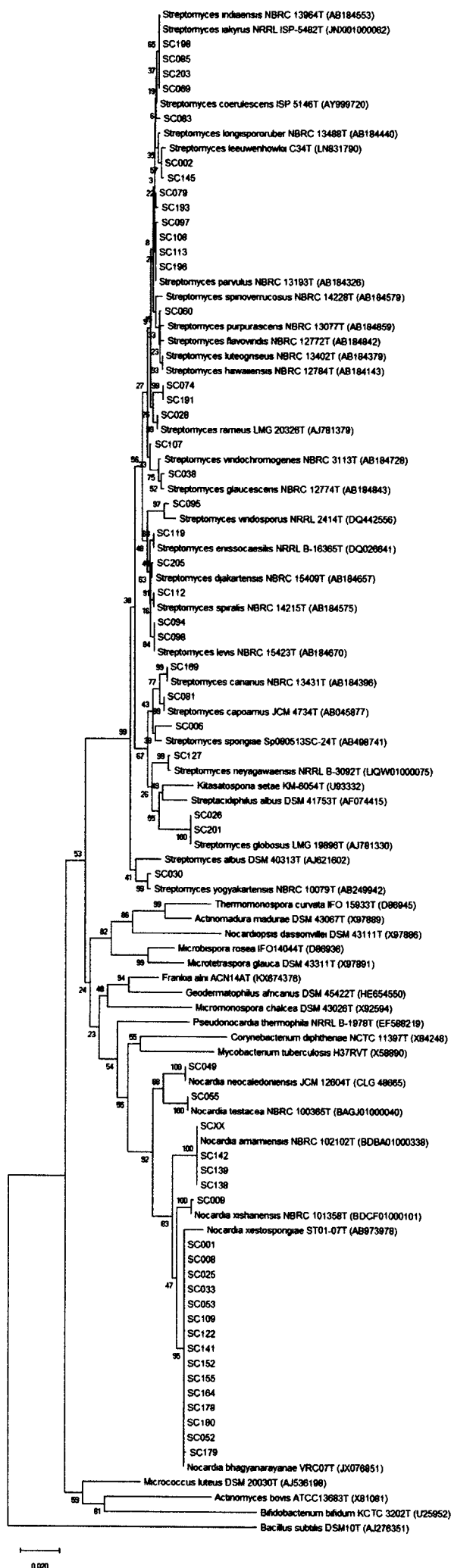
ตารางที่ 4.3 ผล BLASTn search ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

Isolate		Top-hit taxon	similarity (%)	Length (nt)	Accession
No.	no.				no.
1	SC138	<i>Nocardia amamiensis</i> NBRC 102102 ^T	99.93	1462	LC435631
2	SC139	<i>Nocardia amamiensis</i> NBRC 102102 ^T	100	1454	LC435632
3	SC142	<i>Nocardia amamiensis</i> NBRC 102102 ^T	99.35	1401	LC435633
4	SCXX	<i>Nocardia amamiensis</i> NBRC 102102 ^T	100	1457	LC435634
5	SC001	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.44	1466	LC435635
6	SC008	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.58	1460	LC435636
7	SC025	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1398	LC435637
8	SC033	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1400	LC435638
9	SC053	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.44	1466	LC435639
10	SC109	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1414	LC435640
11	SC122	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1400	LC435641
12	SC141	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.93	1394	LC435642
13	SC152	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.72	1452	LC435643
14	SC155	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1396	LC435644
15	SC164	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.79	1485	LC435645
16	SC178	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1427	LC435646
17	SC179	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	99.9	1468	LC435647
18	SC180	<i>Nocardia bhagyanarayanae</i> VRC07 ^T	100	1463	LC435648
19	SC058	<i>Nocardia lijiangensis</i> NBRC 108240 ^T	99.75	834	LC435630
20	SC049	<i>Nocardia neocaledoniensis</i> JCM 12604 ^T	99.93	1388	LC435649
21	SC055	<i>Nocardia testacea</i> NBRC 100365 ^T	99.65	1484	LC435650
22	SC052	<i>Nocardia xestospongiae</i> ST01-07 ^T	97.84	1415	LC435651
23	SC009	<i>Nocardia xishanensis</i> NBRC 101358 ^T	99.17	1466	LC435652
24	SC169	<i>Streptomyces canarius</i> NBRC 13431 ^T	99.2	1461	LC435653
25	SC081	<i>Streptomyces capoamus</i> JCM 4734 ^T	99.65	1469	LC435654
26	SC079	<i>Streptomyces coerulescens</i> ISP 5146 ^T	99.77	1288	LC435655
27	SC097	<i>Streptomyces coerulescens</i> ISP 5146 ^T	99.44	1474	LC435656
28	SC205	<i>Streptomyces djakartensis</i> NBRC 15409 ^T	99.71	1423	LC435657
29	SC119	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL-B 16365 ^T	100	1469	LC435658
30	SC060	<i>Streptomyces flavoviridis</i> NBRC 12772 ^T	99.17	1471	LC435659
31	SC038	<i>Streptomyces glaucescens</i> NBRC 12774 ^T	99.61	1325	LC435660
32	SC026	<i>Streptomyces globosus</i> LMG 19896 ^T	100	1445	LC435661
33	SC201	<i>Streptomyces globosus</i> LMG 19896 ^T	100	1047	LC435662

ตารางที่ 4.3 ผล BLASTn search ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ต่อ)

No.	Isolate no.	Top-hit taxon	similarity (%)	Length (nt)	Accession no.
34	SC069	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NBRC 12784 ^T	99.52	1471	LC435663
35	SC203	<i>Streptomyces iakyrus</i> NRRL ISP-5482 ^T	99.86	1402	LC435664
36	SC083	<i>Streptomyces indiaensis</i> NBRC 13964 ^T	99.31	1486	LC435665
37	SC085	<i>Streptomyces indiaensis</i> NBRC 13964 ^T	99.93	1473	LC435666
38	SC002	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	99.38	1461	LC435667
39	SC094	<i>Streptomyces levis</i> NBRC 15423 ^T	100	1410	LC435668
40	SC098	<i>Streptomyces levis</i> NBRC 15423 ^T	100	1459	LC435669
41	SC108	<i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC 13488 ^T	99.44	1468	LC435670
42	SC113	<i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC 13488 ^T	99.43	1452	LC435671
43	SC189	<i>Streptomyces luteogriseus</i> NBRC 13402 ^T	99.65	1457	LC435672
44	SC127	<i>Streptomyces neyagawaensis</i> NRRL-B 3092 ^T	99.59	1491	LC435673
45	SC145	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	98.96	1455	LC435674
46	SC196	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	99.86	1467	LC435675
47	SC193	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077 ^T	99.45	1472	LC435676
48	SC028	<i>Streptomyces rameus</i> LMG 20326 ^T	100	1412	LC435677
49	SC074	<i>Streptomyces spinoverrucosus</i> NBRC 14228 ^T	98.93	1428	LC435678
50	SC191	<i>Streptomyces spinoverrucosus</i> NBRC 14228 ^T	99.17	1482	LC435679
51	SC112	<i>Streptomyces spiralis</i> NBRC 14215 ^T	99.01	1122	LC435680
52	SC006	<i>Streptomyces spongiae</i> Sp080513SC-24 ^T	98.92	1393	LC435681
53	SC107	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> NBRC 3113 ^T	99.36	1409	LC435682
54	SC095	<i>Streptomyces viridosporus</i> NRRL 2414 ^T	98.27	1487	LC435683
55	SC030	<i>Streptomyces yogyakartensis</i> NBRC100779 ^T	99.51	1432	LC435684

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับตัวแทนสกุล (type species) ของไฟลัมแอคติโนแบคทีเรียพบว่า 23 ไอโซเลต ที่จำแนกเป็นสกุล *Nocardia* อยู่ใน node เดียวกันกับตัวแทนของสมาชิกของสกุล *Nocardia* และอยู่ใน clade เดียวกันกับตัวแทนสกุลของวงศ์ *Nocardiaceae* นอกจากนี้ แอคติโนแบคทีเรียจำนวน 32 ไอโซเลต ที่จำแนกเป็นสกุล *Streptomyces* ได้อยู่ใน clade เดียวกันกับตัวแทนสมาชิกของวงศ์ *Streptomycetaceae* และอยู่ใน node เดียวกันกับสมาชิกของสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.1) จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจึงยืนยันผลของ BLASTn search และลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสามารถสรุปได้ว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเกาะสี่ช้างเป็นสมาชิกของสกุลใหญ่สองสกุล คือ *Nocardia* และ *Streptomyces*



Family Streptomycetaceae

Family Nocardiaceae

รูปที่ 4.1 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี กับตัวแทนของสกุลในไฟลัมแอกติโนแบคทีเรีย

4.4 แอคติโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่

ในการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียเมื่อจะสรุปผลว่าไอโซเลตที่กำลังศึกษาเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่สามารถยืนยันได้โดยการเปรียบเทียบการเข้ากันได้ของจีโนมของแบคทีเรียดังกล่าวกับสายพันธุ์ใกล้เคียง (DNA-DNA hybridization) ในกรณีที่จีโนมของทั้งสองสายพันธุ์เข้าคู่กันได้น้อยกว่าร้อยละ 70 จะถือว่าสายพันธุ์ที่ค้นพบนั้นเป็นสายพันธุ์ใหม่ (Wayne et al., 1987) ในปี 2006 Stackebrandt และ Eber ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-DNA hybridization และ 16S rRNA gene similarity และพบว่าเมื่อนำจีโนมของแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่มีค่าความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene ต่ำกว่า 98.7% มาเข้าคู่กันส่วนใหญ่จะพบว่ามีความเข้ากันได้ของจีโนมต่ำกว่าร้อยละ 70 ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงค้นหาแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่จากค่า 16S rRNA gene ของไอโซเลตที่มีค่าต่ำกว่า 98.7%

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรีครั้งนี้พบว่าแอคติโนแบคทีเรียสองไอโซเลตคือ SC052 และ SC095 มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene กับ *Nocardia xestospongiae* ST01-07^T ที่ 97.84% และ *Streptomyces viridosporus* NRRL 2414^T ที่ 98.27% ตามลำดับ ดังนั้นทั้งสองไอโซเลตนี้จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาไอโซเลต SC052 มีการสร้างเส้นใยอาหารที่มีการแตกหักซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อสกุล *Nocardia* และ ไอโซเลต SC095 มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศที่มีลักษณะเป็นเกลียวคล้ายสปริง (spiral type) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในสกุล *Streptomyces* ดังนั้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene จึงสามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลต SC052 และ SC095 น่าจะเป็นเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ในสกุล *Nocardia* และ *Streptomyces* ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)

ในปี 2010 Takeda และคณะได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสมาชิกในสกุล *Nocardia* และพบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *gyrB* gene จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากกว่า 16S rRNA gene ในการศึกษาเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลต SC052 กับสมาชิกของสกุล *Nocardia* ทั้งหมดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *gyrB* gene พบว่า ไอโซเลต SC052 จัดอยู่ใน clade เดียวกันกับ *N. araoensis* DSM44729^T และ *N. beijingensis* JCM 10666^T ที่ค่า bootstrap มากกว่า 50 ดังนั้นในการศึกษาทางอนุกรมวิธานเชิงลึกเพื่อเสนอเป็นสายพันธุ์ใหม่ในอนาคตจำเป็นต้องเลือกตัวแทนของสองสปีชีส์นี้มาศึกษาเปรียบเทียบต่อไป (รูปที่ 4.3)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลต SC095 กับสมาชิกของสกุล *Streptomyces* ที่มีความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene จำนวน 29 สายพันธุ์และสมาชิกของวงศ์ *Streptomycetaceae* พบว่าไอโซเลต SC095 อยู่ใน clade เดียวกันกับ *S. ghanaensis* NBRC 15414^T และ *S. viridosporus* NRRL 2414^T ที่ค่า bootstrap มากกว่า 50 ดังนั้นในการศึกษาทางอนุกรมวิธานเชิงลึกในอนาคตจะต้องเลือกสองสายพันธุ์นี้มาเปรียบเทียบกับไอโซเลต SC095 ต่อไป (รูปที่ 4.4)



(ก)



(ข)

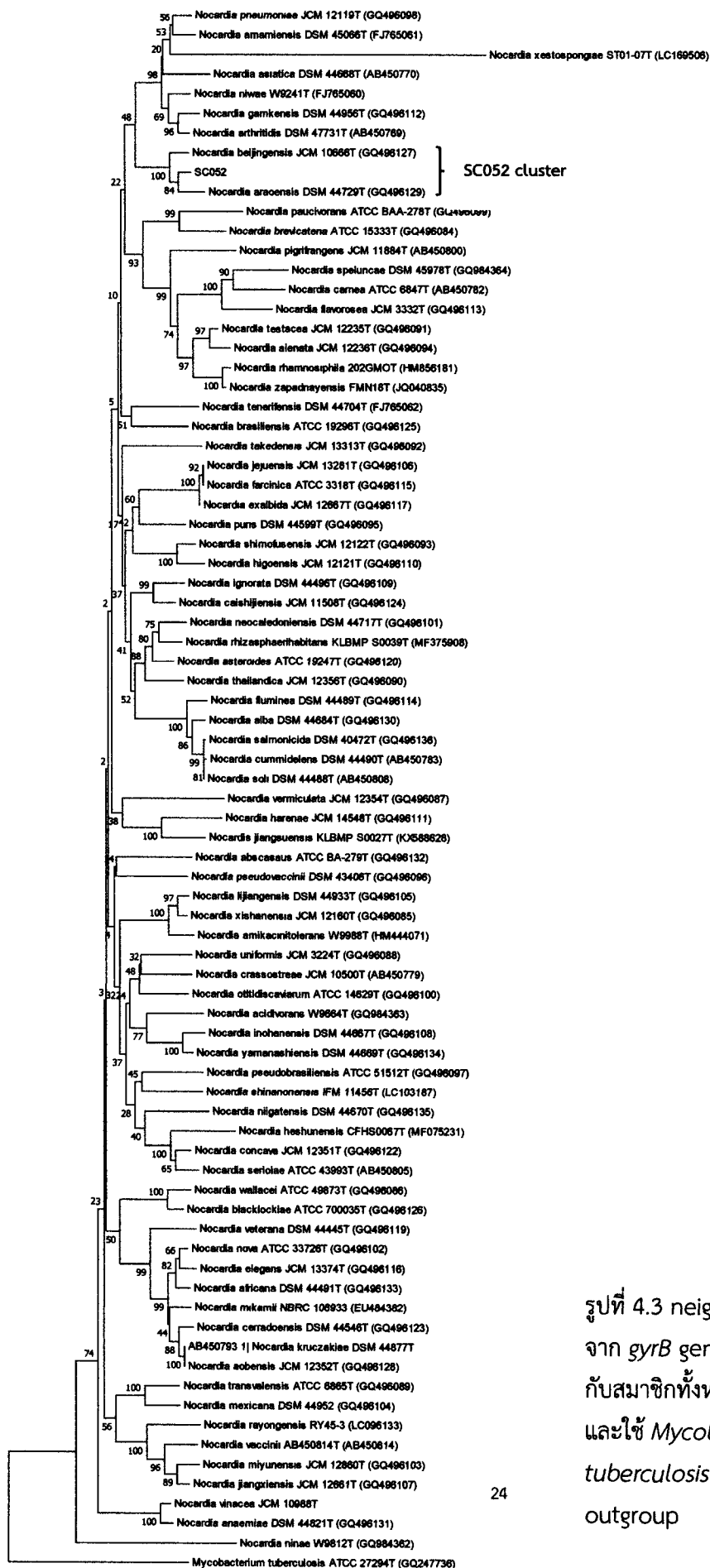


(ค)

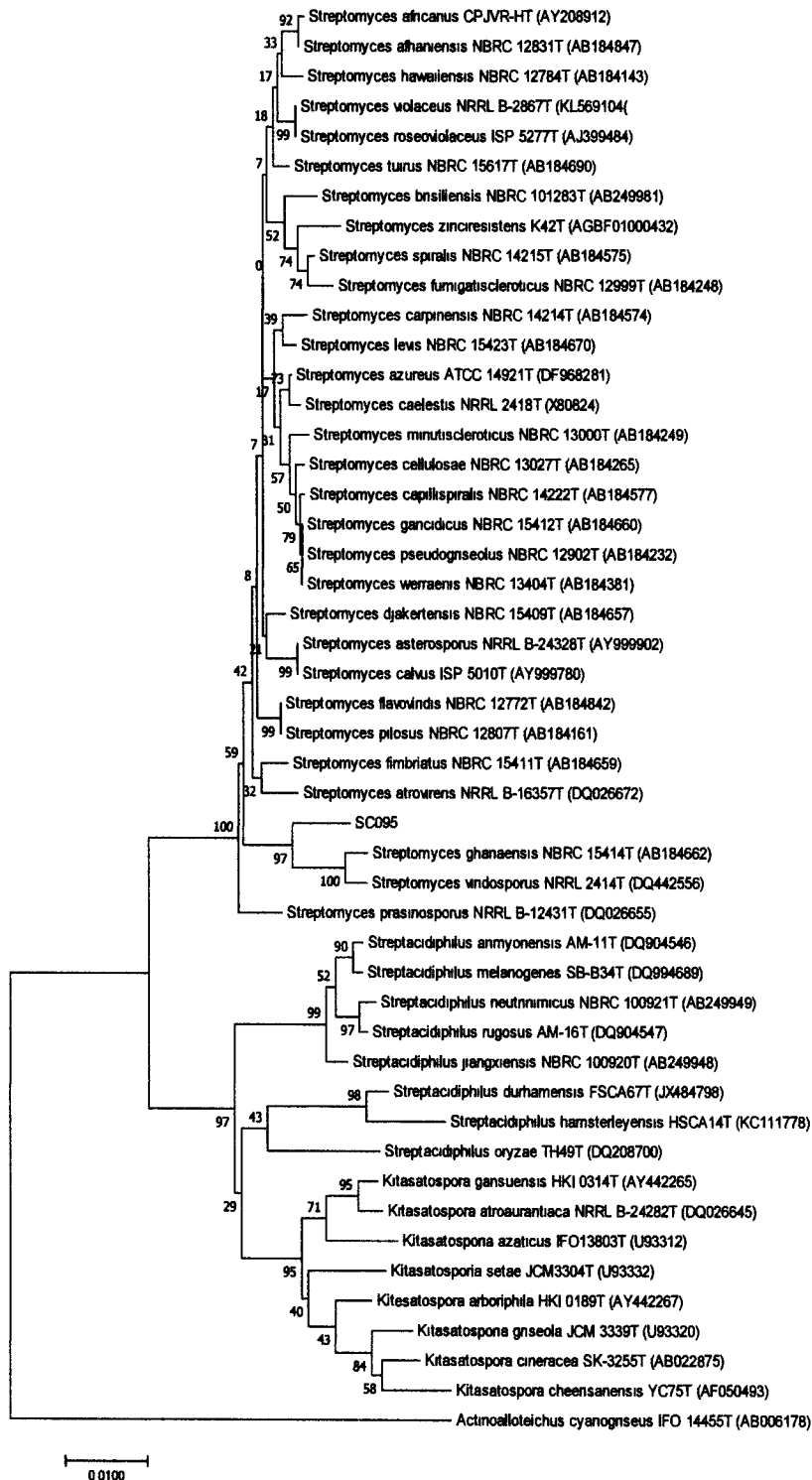


(ง)

รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะป็นสายพันธุ์ใหม่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (ก) การเจริญและ(ข) สัณฐานวิทยาของไอโซเลต SC052 แสดงให้เห็นถึงเส้นใยอาหารที่แตกหัก (ครีซี) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardia* และ (ค) การเจริญและ (ง) สัณฐานวิทยาของไอโซเลต SC095 แสดงให้เห็นถึงสายสปอร์ที่เป็นเกลียวบนเส้นใยอากาศ (ครีซี) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.3 neighbour joining tree จาก *gyrB* gene ของไอโซเลต SC052 กับสมาชิกทั้งหมดของสกุล *Nocardia* และใช้ *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294^T เป็น outgroup



รูปที่ 4.4 neighbour joining tree จาก 16S rRNA gene ของไอโซเลต SC095 กับสมาชิกที่มีความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene สูงที่สุด กับสมาชิกของวงศ์ *Streptomycetaceae* *Actinoalloteichus cyanogriseus* IFO 14455^T ถูกใช้เป็น out group

4.5 การคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่า *Streptomyces* จำนวน 22 ไอโซเลต จาก 32 ไอโซเลตแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 68.8 ของ *Streptomyces* ที่คัดแยกได้ โดย *Streptomyces* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจำนวน 21 ไอโซเลตแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์พบว่า มี 3 และ 7 ไอโซเลต ตามลำดับที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพกลุ่มดังกล่าวได้ นอกจากนี้ *Nocardia* ทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 4,4) ตัวอย่างงานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้แสดงในรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

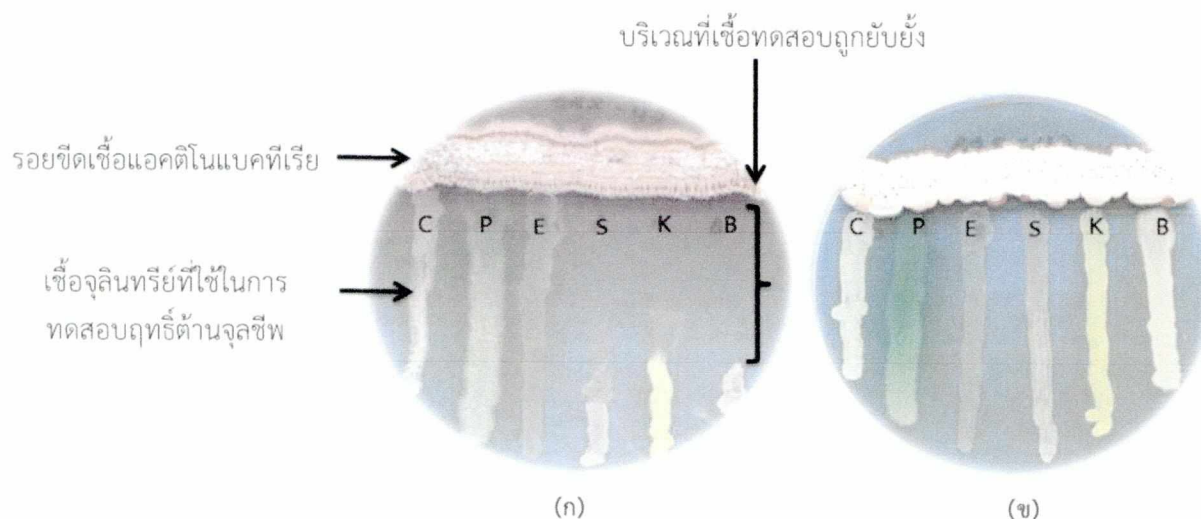
No.	Isolate no.	Genus	Inhibition area (mm)					
			<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	SC138	<i>Nocardia</i>	-	-	-	-	-	-
2	SC139		-	-	-	-	-	-
3	SC142		-	-	-	-	-	-
4	SCXX		-	-	-	-	-	-
5	SC001		-	-	-	-	-	-
6	SC008		-	-	-	-	-	-
7	SC025		-	-	-	-	-	-
8	SC033		-	-	-	-	-	-
9	SC053		-	-	-	-	-	-
10	SC109		-	-	-	-	-	-
11	SC122		-	-	-	-	-	-
12	SC141		-	-	-	-	-	-
13	SC152		-	-	-	-	-	-
14	SC155		-	-	-	-	-	-
15	SC164		-	-	-	-	-	-
16	SC178		-	-	-	-	-	-
17	SC179		-	-	-	-	-	-
18	SC180		-	-	-	-	-	-
19	SC058		-	-	-	-	-	-
20	SC049		-	-	-	-	-	-
21	SC055		-	-	-	-	-	-
22	SC052		-	-	-	-	-	-
23	SC009		-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4ฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ต่อ)

No.	Isolate no.	Genus	Inhibition area (mm)					
			<i>S.</i> <i>sureus</i>	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>K.</i> <i>rhizophila</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>
24	SC169	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-	-
25	SC081		-	-	-	-	-	-
26	SC079		-	-	-	-	-	-
27	SC097		2	2	8	-	-	-
28	SC205		30	30	30	-	-	-
29	SC119		30	30	30	30	5	7
30	SC060		-	-	-	-	-	-
31	SC038		-	-	-	-	-	-
32	SC026		-	-	-	-	-	-
33	SC201		-	7	-	-	-	-
34	SC069		26	10	30	-	-	-
35	SC203		7	15	7	-	-	2
36	SC083		30	25	25	-	-	7
37	SC085		-	20	2	-	-	-
38	SC002		-	-	-	-	-	-
39	SC094		2	7	11	-	-	2
40	SC098		8	8	11	-	-	2
41	SC108		-	-	-	-	3	-
42	SC113		-	3	-	-	-	-
43	SC189		21	18	30	-	-	-
44	SC127		30	30	30	-	-	-
45	SC145		-	5	-	-	-	30
46	SC196		32	40	40	-	-	-
47	SC193		25	31	31	-	-	-
48	SC028		-	-	-	-	-	-
49	SC074		14	15	8	-	-	3
41	SC108		-	-	-	-	3	-
42	SC113		-	3	-	-	-	-
43	SC189		21	18	30	-	-	-
44	SC127		30	30	30	-	-	-
45	SC145		-	5	-	-	-	30
46	SC196		32	40	40	-	-	-
48	SC028		-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ต่อ)

No.	Isolate no.	Genus	Inhibition area (mm)					
			S. <i>sureus</i>	B. <i>subtilis</i>	K. <i>rhizophila</i>	E. <i>coli</i>	P. <i>aeruginosa</i>	C. <i>albicans</i>
47	SC193		25	31	31	-	-	-
48	SC028		-	-	-	-	-	-
49	SC074		14	15	8	-	-	3
50	SC191	<i>Streptomyces</i>	24	22	18	-	-	10
51	SC112		-	-	5	-	-	-
52	SC006		-	-	-	-	-	-
53	SC107		-	-	18	-	5	-
54	SC095		40	40	20	-	-	-
55	SC030		-	-	-	-	-	-



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ก) แอคติโนแบคทีเรียในภาพมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* *K. rhizophila* และ *S. aureus* จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสามชนิดไม่สามารถเจริญเข้าใกล้บริเวณที่มีรอยขีดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (ข) แสดงตัวอย่างแอคติโนแบคทีเรียที่ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญเข้าใกล้กับรอยขีดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียได้

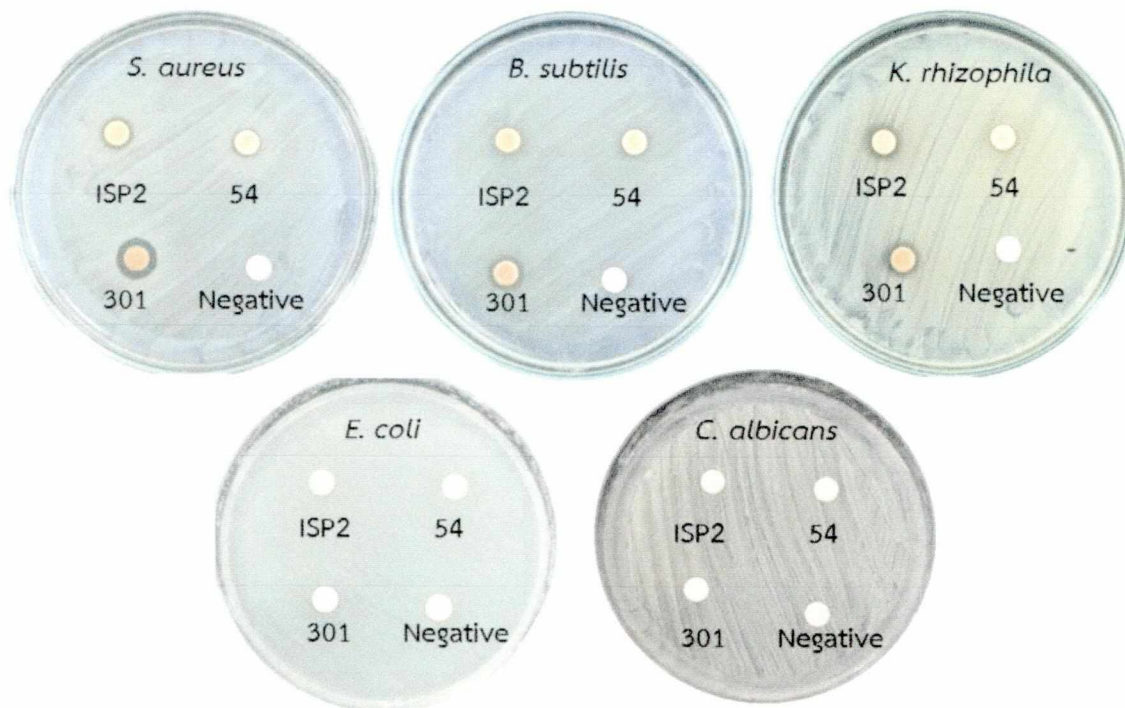
4.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้

ในการศึกษานี้แอคติโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่สองสายพันธุ์คือ SC052 และ SC095 อย่างไรก็ตามจากการคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นพบว่ามีเพียงไอโซเลต SC095 แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ คือ *B. subtilis* *K. rhizophila* และ *S. aureus*

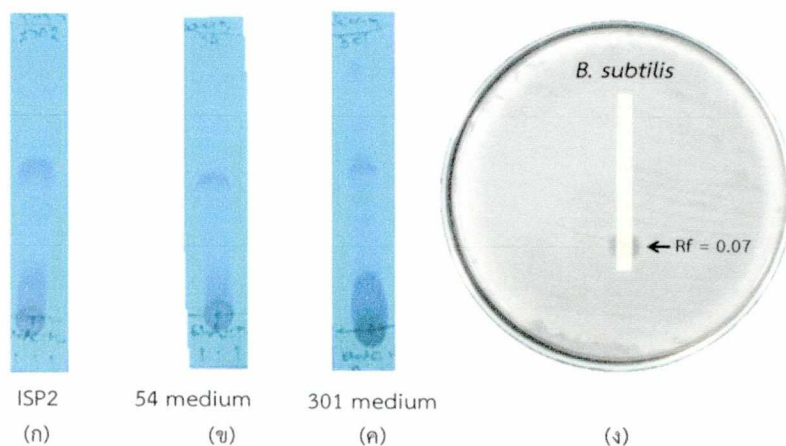
เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากไอโซเลต SC095 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบจากอาหารทั้งสามชนิดแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพแถมบวกเช่นเดียวกับการคัดกรองเบื้องต้น อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารแต่ละชนิดให้ความกว้างของโซนยับยั้งไม่เท่ากัน (ตาราง 4.5 และรูปที่ 4.6) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดหยาบมาพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography และใช้ ethylacetate : Hexane 1:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ UV ที่ 254 นาโนเมตรในการตรวจสอบพบว่าองค์ประกอบพื้นฐานของสารสกัดหยาบจากอาหารทั้งสามชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน และเมื่อนำ TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากอาหาร 301 medium ไปทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis* โดยวิธี bioautography พบว่าเกิดโซนยับยั้งที่ $R_f = 0.07$ ดังนั้นจึงคาดการณ์ได้ว่าองค์ประกอบของสารเมแทบอไลต์ที่อยู่บริเวณ R_f ดังกล่าวเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (รูปที่ 4.7) โดยข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปต่อยอดในขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	โซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
54 medium	7.6	7.6	7.0	-	-
301 medium	10.6	9.8	9.8	-	-
ISP2 medium	8.7	9.8	9.8	-	-



รูปที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อดิสก์



รูปที่ 4.7 TLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต SC095 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 (ก) 54 (ข) และ 301 medium (ค) เมื่อใช้ ethylacetate : Hexane 1:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้แสง UV ที่ 254 นาโนเมตร ในการตรวจสอบ (ง) bioautography ของสารสกัดหยาบจากอาหาร 301 medium ต่อเชื้อ *B. subtilis* แสดงให้เห็นโซนยับยั้งบริเวณ $R_f = 0.07$

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ในการศึกษานี้สามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 55 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ 16S rRNA gene สามารถสรุปได้ว่าแอกติโนแบคทีเรียบนเกาะสีชังที่คัดแยกได้เป็นสกุล *Nocardia* และ *Streptomyces* จำนวน 23 และ 32 ไอโซเลตตามลำดับ และพบว่าแอกติโนแบคทีเรียสองไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SC052 และ SC095 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia xestospongiae* ST01-07^T ที่ 97.84% และ *Streptomyces viridosporus* NRRL 2414^T ที่ 98.27% ตามลำดับ มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่เนื่องจากมีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับแอกติโนแบคทีเรียที่เคยมีรายงานมาก่อน และเมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าทุกไอโซเลตที่เป็นสกุล *Nocardia* ไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพในการทดสอบครั้งนี้ แต่พบว่ามี *Streptomyces* 22 ไอโซเลต จาก 32 ไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 68.8 ของ *Streptomyces* ที่คัดแยกได้ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* ไอโซเลต SC095 ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่นั้น แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นไอโซเลต SC095 จึงเป็นที่น่าสนใจทั้งในด้านอนุกรมวิธานและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะพบแอกติโนแบคทีเรียที่คาดว่าจะสายพันธุ์ใหม่ถึงสองสายพันธุ์และหนึ่งในนั้นแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการศึกษาอนุกรมวิธานเชิงลึกเพื่อที่จะตีพิมพ์เสนอเป็นชื่อสายพันธุ์ใหม่นั้นจำเป็นต้องใช้หลายเทคนิคในการตรวจสอบ รวมถึงการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปีในการตรวจสอบ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ทุนวิจัยเพิ่มเติมซึ่งทุนวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ครอบคลุมถึง ดังนั้นในอนาคตผู้วิจัยจึงมีแผนที่จะขอทุนสนับสนุนวิจัยเพิ่มเติมเพื่อนำมาตอบโจทย์สิ่งที่ได้ค้นพบจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ต่อไป

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Humic acid vitamin agar

Humic acid	1	g
Na ₂ HPO ₄	0.5	g
KCl	1.71	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g
CaCO ₃	0.02	g
B-vitamins*		
Agar	18	g
Distilled water	1000	mL
pH 7.2		

*0.05 mg ของ thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid, และ 0.5 mg ของ biotin (ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง)

Yeast extract - malt extract agar (ISP2 agar)

Yeast extract	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Agar	18	g
Distilled water	1000	mL
pH 7.0-7.2		

Yeast extract – malt extract broth (ISP2 broth)

Yeast extract	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Distilled water	1000	mL
pH 7.0-7.2		

54 medium

Soluble starch	20.0	g
Glycerol	5.0	g
Defatted wheat germ	10.0	g
Meat extract	3.0	g
Yeast extract	3.0	g

CaCO ₃	3.0	g
Tap water	0.5	L
Artificial seawater	0.5	L
pH 7.4 - 7.8		

301 medium

Soluble starch	24.0	g
Glucose	1.0	g
Peptone	3.0	g
Meat extract	3.0	g
Yeast extract	5.0	g
CaCO ₃	4.0	g
Distilled water	500	mL
Artificial seawater	500	mL
pH 7.0		



เอกสารอ้างอิง

- Ando, K., Murakami, Y. and Nawata, Y. 1971. Tetranactin, a new miticidal antibiotic. II. Structure of tetranactin. J. Antibiot. 24: 418-422.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80: 1-42.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58: 1-26.
- El-Nakeeb, M. A. and Lechevalier, H.A. 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 11: 75-77.
- Endo, A. and Misato, T. 1969. Polymyxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Co. 37: 718-722.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycete. Ferment. Technol. 65: 501-509.
- Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y. and Suzuki, S. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. Agri. Bio. Chem. 29: 848-854.
- Jizba, J., Sedmera, P., Zima, J., Beran, M., Blumauerova, M., Kandybin, M. and Samoukina, G. 1991. Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. Folia Microbiol. 36: 437-443.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008a. *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 127-133.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008b. *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 924-928.
- Kameda, Y. 1987. Validoxylamines as trehalase inhibitors. J. Antibiot. 40: 563-565.
- Küster, E. and Williams, S. T. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature. 202: 928-929.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.J., Trujillo, M. E., Kampfer, P., and Whitman, W. B. 2012. Road map of the phylum *Actinobacteria*. In M. Goodfellow, P. Kampfer, M. J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig and W. B. Whitman (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 5. Springer, New York, pp. 1-28.
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 435-443.

- Lechevalier, M. P. Bievre, C. D. and Lechevalier, H. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 249-260.
- Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2017. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J. Antibiot.* 70: 514-519.
- Mingma, R., Duangmal, K., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2014. *Sphaerisporangium rufum* sp. nov., an endophytic actinomycete from roots of *Oryza sativa* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 1077-1082.
- Mingma, R., Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Trakulnaleamsai, S., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2015. *Streptomyces oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from stems of rice plant. *J. Antibiot.* 68: 368-372.
- Misato, T. 1982. Present status and future prospects of agricultural antibiotics. *J. Pest. Sci.* 7: 301-305.
- Nienhom, N., Chutraku, C., Suriyachadkun, C. and Thawai, C. 2016a. *Asanoa endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1377-1382.
- Nienhom, N., Chutrakul, C., Suriyachadkun, C. and Thawai, T. 2016b. *Phytohabitans kaempferiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2917-2922.
- Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (Part 1). *J. Ferment. Technol.* 47: 463-469.
- Phongsopitanun, W., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. and Kudo, T. 2015a. *Actinomadura rayongensis* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 890-895.
- Phongsopitanun, W., Kudo, T., Ohkuma, M., Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2015b. *Dactylosporangium sucinum* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. *J. Antibiot.* 68: 379-384.
- Phongsopitanun, W., Kudo, T., Mori, M., Shiomi, K., Pittayakkhajonwut, P., Suwanborirux, K., et al. 2015c. *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 4417-4423.
- Rachniyom, H., Matsumoto, A., Indananda, C., Duangmal, K., Takahashi, Y. and Thamchaipenet, A. 2015a. *Actinomadura syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1946-1952.
- Rachniyom, H., Matsumoto, A., Indananda, C., Duangmal, K., Takahashi, Y. & Thamchaipenet, A. 2015b. *Nonomuraea syzygii*, sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1234-1240.

- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Songsumanus, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Suwanborirux, K. and Kudo, T. 2011. *Micromonospora humi* sp. nov. isolated from peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1176-1181.
- Songsumanus, A., Tanasupawat, S., Igarashi, Y. and Kudo, T. 2013. *Micromonospora maritima* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 554-559.
- Stackebrandt, E., & Eber, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 6: 152-155.
- Sripreechasak, P., Matsumoto, A., Suwanborirux, K., Inahashi, Y., Shiomi, K., Tanasupawat, S., et al., (2013). *Streptomyces siamensis* sp. nov., and *Streptomyces similanensis* sp. nov., isolated from Thai soil. *J. Antibiot.* 66: 633-640.
- Sripreechasak, P., Tamura, T., Shibata, C., Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2016. *Streptomyces andamanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2030-2034.
- Sripreechasak, P., Phongsopitanun, W., Tamura, T. and Tanasupawat, S. 2017. *Streptomyces krungchingensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 50-54.
- Supong, K., Suriyachadkun, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P., Kudo, T., et al. 2013a. *Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 570-575.
- Supong, K., Suriyachadkun, C., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K. and Thawai, C. 2013b. *Micromonospora spongicola* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *J. Antibiot.* 66: 505-509.
- Supong, K., Suriyachadkun, C., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P. and Thawai, C. 2013c. *Verrucosispora andamanensis* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3970-3974.
- Suriyachadkun, C., Chunhametha, S., Thawai, C., Tamura, T., Potacharoen, W., Kirtikara, K. and Sanglier, J. 2009. *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 992-997.
- Phongsopitanun, W., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., Ohkuma, M. and Tanasupawat, S. 2014. *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2605-2610.
- Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gono, T. and Mikami, Y. 2010. Phylogenetic studies on *Nocardia* species based on *gyrB* gene analysis. *J. Med. Microbiol.* 59: 165-171.
- Tanasupawat, S., Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. and Kudo, T. 2016a. *Streptomyces actinomycinicus* sp. nov., isolated from soil of a peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 290-295.

- Tanasupawat, S., Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. and Kudo, T. 2016b. *Nocardia rayongensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 1960-1955.
- Thawai, C., Tanasupawat S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. and Kudo, T. 2005a. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. and Kudo, T. 2005b. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. J. Gen. Appl. Microbiol. 51: 229-234.
- Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M. and Takeuchi, T. 1965. A new antibiotic, kasugamycin. J. Antibiot. 18: 101-103.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., et al. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67: 1613-1617.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. et al. 1987. International committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematic. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 463-464.