รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาทางเคมีและความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย
ที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่

Chemistry and Biodiversity Studies of Actinobacteria Isolated from Soil in Khao Khieo - Khao Chomphu Wildlife Sanctuary Area

หัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวภรณี ศรีปรีชาศักดิ์

ผู้ร่วมวิจัย
นายอนันต์ อธิพรชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 138/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาทางเคมีและความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย ที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่

Chemistry and Biodiversity Studies of Actinobacteria Isolated from Soil in Khao Khieo - Khao Chomphu Wildlife Sanctuary Area

หัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวภรณี ศรีปรีชาศักดิ์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ร่วมวิจัย
นายอนันต์ อธิพรชัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มีนาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ 256109A1080040 เลขที่สัญญา 138/2561

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตัวอย่างดินบริเวณเขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมพู่ จังหวัดชลบุรี และคัดกรองฤทธิ์ต้านจุลชีพของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือก จากการทดลองสามารถคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 132 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกออกเป็น 5 สกุล ได้แก่ *Actinmadura* (1.5%), *Micromonospora* (11.4%), *Nocardia* (6.1%), *Nonomuraea* (4.5%) และ *Streptomyces* (76.5%) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางจีโนไทป์ ซึ่งประกอบด้วย การวิเคราะห์ลำดับเบสและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA และมีแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 7 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มว่าเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora* (ไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5) และสกุล *Streptomyces* (ไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 และ KK08-10) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรีย พบว่า แอคติโนแบคเรียที่คัดแยกได้ จำนวน 46 ไอโซเลท (34.8%) สามารถผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยั้บยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 หรือ *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Streptomyces* ไอโซเลท KK06-20 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพ

ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์

Abstract

The objectives of this research are to study the taxonomy and biodiversity of actinobacteria that isolated from soil samples in Khao Khieo - Khao Chomphu Wildlife Sanctuary Area, Chonburi Provine and screening for antimicrobial activity of secondary metabolites which produced from the actinobacteria. In the experiment, 132 isolates of actinobacteria were classified into 5 genera which were *Actinmadura* (1.5%), *Micromonospora* (11.4%), *Nocardia* (6.1%), *Nonomuraea* (4.5%) and *Streptomyces* (76.5%) based on morphological and genotypic characteristics by using sequencing and phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene. There were 7 isolates that tend to be new species in the genera *Micromonospora* (KK12-4 and KK12-5) and *Streptomyces* (KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 and KK08-10). In addition, the antimicrobial activity of secondary metabolites from actinobacteria were determined. The secondary metabolites that produced from 46 isolates showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria; *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 25923 or yesast; *Candida albicans* ATCC 10231 and *Streptomyces* sp. KK06-20 was the most effective stain in antimicrobial metabolite production.

สารบัญ

		หน้า
1. บทนำ (Introduction)		**1**
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3	ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4	ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
1.5	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6	แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	3
1.7	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)		**10**
2.1	อุปกรณ์และสารเคมี	10
2.2	การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย	13
2.3	การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย	13
2.4	การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น	14
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)		**15**
3.1	การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย	15
3.2	การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย	18
	3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย	18
	3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	56
3.3	การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น	65
4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)		**70**
บรรณานุกรม		71
ประวัติคณะผู้วิจัย		78

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	แอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่คัดแยกได้จากประเทศไทย	6
1-2	แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์	7
1-3	สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในทางการแพทย์	9
3-1	ค่า pH ของตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณ พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ สำหรับคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย	16
3-2	ตัวอย่างดินและแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จำนวน 132 ไอโซเลท	17
3-3	ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	21
3-4	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	23
3-5	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK03 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	25
3-6	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	29
3-7	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK05 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	31
3-8	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK06 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	34
3-9	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK07 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	37
3-10	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK08 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	39
3-11	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK09 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	41
3-12	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK10 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	44

บัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-13	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK11 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	45
3-14	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK12 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	48
3-15	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	50
3-16	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK14 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	52
3-17	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK15 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	54
3-18	ความเหมือนของลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA gene เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strains) ในฐานข้อมูล EZBioCloud	57
3-19	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ND; ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทดสอบ)	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3-1	การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารคัดแยกเชื้อ	16
3-2	จำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่	18
3-3	กราฟแสดงจำนวนแอคติโนแบคทีเรียแต่สกุลที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน	19
3-4	กราฟแสดงความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน	20
3-5	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	22
3-6	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	24
3-7	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK03 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	17
3-8	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	30
3-9	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK05 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	32
3-10	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK06 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	35
3-11	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK07 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	38
3-12	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK08 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	40
3-13	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK09 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	42
3-14	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK10 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	44
3-15	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK11 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	46

ภาพที่ **หน้า**

3-16	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK12 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	49
3-17	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK13เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	51
3-18	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK14 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	53
3-19	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK15 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	55
3-20	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแอคติโนแบคทีเรียกับการจัดจำแนกในระดับสกุลของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) ในฐานข้อมูล EZBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/)	59
3-21	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 70 ไอโซเลท กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strains)	61
3-22	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Micromonospora*	62
3-23	ลักษณะโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยอาหารของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK12-4	63
3-24	ลักษณะโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยอาหารของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK12-5	63
3-25	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK05-18, KK04-5 และ KK08-10 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Streptomyces*	64
3-26	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK04-5	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-27	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK08-10	65
3-28	กราฟแสดงจำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบ	69

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันแม้ว่าความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์ การแพทย์ เภสัชกรรม และสาธารณสุขจะมีเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีโรคอีกหลายโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เนื่องจากไม่มีวัคซีนหรือยาเฉพาะที่สามารถรักษาโรคได้โดยตรง เช่น โรคเอดส์ โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ หรือโรคติดเชื้อต่างๆที่มีการระบาดอย่างรุนแรงที่เป็นโรคอุบัติใหม่ เช่น โรคติดเชื้อไวรัสอีโบลา (Ebola virus) โรคติดเชื้อไวรัสเมอร์ส (MERS-CoV) เป็นต้น โรคติดเชื้อนั้นนับเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของคนเป็นจำนวนมาก และยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบันมีทั้งยาที่เป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติ และยาที่สังเคราะห์โดยปฏิกิริยาทางเคมี โดยในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าปัญหาเชื้อดื้อยามีผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศชาติ อีกทั้งในอนาคตมีการคาดการณ์ว่าปัญหาเชื้อดื้อยาจะทวีความรุนแรงมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ เพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อและโรคอื่น ๆ ในปัจจุบัน หรือโรคใหม่ที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) เป็นองค์ประกอบในจีโนมมากกว่า 50 mol% สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในระบบนิเวศที่เป็นแหล่งน้ำและผืนดิน ในธรรมชาติแอคติโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในระบบนิเวศ ทำให้ระบบนิเวศเกิดความสมดุล และเป็นที่ทราบกันดีว่าแอคติโนแบคทีเรียนั้นสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิหรือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตได้นั้นประมาณสองในสามมีการนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาโรคในปัจจุบัน เช่น avermectin, erythromycin, gentamicin, neomycin, rifamycin, streptomycin, tetracycline และ vancomycin เป็นต้น นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรียยังผลิตสารบางชนิดที่นำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง ยาฆ่าพยาธิ ยาฆ่าแมลง หรือสารต้านเชื้อรา เป็นต้น ดังนั้นแอคติโนแบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ เภสัชกรรม และการเกษตร

เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทำให้มีการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน สิ่งมีชีวิตหรือตะกอนดินในทะเล สัตว์ และพืช เป็นจำนวนมาก เช่น *Actinomadura rayongensis*, *Actinoplanes lichenis*, *Dactylosporangium sucinum*, *Micromonospora chaiyaphumensis*, *Micromonospora costi*, *Micromonospora eburnea*, *Micromonospora fluostatini*, *Micromonospora sediminis*, *Micromonospora*

siamensis, *Micromonospora spongicola*, *Nocardia rayongensis*, N*onomuraea thailandensis*, *Nonomuraea monospora*, *Streptomyces actinomycinicus*, *Streptomyces siamensis*, *Streptomyces similanensis*, *Streptomyces andamanensis*, *Streptomyces chumphonensis*, *Verrucosispora andamanensis* เป็นต้น ส่วนการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียในประเทศไทยนั้นยังมีน้อยมาก ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่แยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย เช่น สาร Streptophenazine I ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC21835 เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้าน *Bacillus cereus* สาร samroiyotmycins A และ B ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC33756 เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 สายพันธุ์ที่ดื้อยา และสาร urdamycinone E, urdamycinone G และ dehydro-xyaquayamycin ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC45596 เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 และ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นต้น ถึงแม้ว่าในประเทศไทยมีการค้นพบสารใหม่จากแอคติโนแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิด แต่ก็พบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ ซึ่งถ้าหากมีการศึกษาวิจัยทางด้านนี้มากขึ้น ก็อาจจะส่งผลให้มีการค้นพบสารชนิดใหม่ หรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่น่าสนใจเพิ่มมากขึ้นต่อไปในอนาคต

พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จังหวัดชลบุรี เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยป่าสงวนแห่งชาติ มีลักษณะเป็นภูเขาสูงชัน โดยทั่วไปประกอบด้วยป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณ ที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพรรณไม้และสัตว์ป่านานาชนิด และเป็นแหล่งกำเนิดของต้นน้ำลำธารของอ่างเก็บน้ำบางพระ ซึ่งเป็นแหล่งน้ำจืดที่ใหญ่ที่สุดของภาคตะวันออก จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ เป็นบริเวณที่มีทั้งส่วนที่เป็นผืนดินและผืนป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางธรรมชาติและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงเป็นแหล่งธรรมชาติที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรีย

ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ ที่จะทำให้เกิดการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่การค้นพบและพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตัวอย่างดินบริเวณเขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมพู่
2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากแอคติโนแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) การแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่
2) การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือก
3) การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียนำไปสู่การค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ และการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่นี้จะนำไปสู่การค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่หรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่หรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จะนำไปสู่การค้นพบและพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่พบในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ และสามารถสร้างคลังฐานข้อมูลแอคติโนแบคทีเรียเพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานด้านต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต
2) ค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์หรือสปีชีส์ใหม่ ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานทางจุลชีววิทยา และสามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยอื่น ๆ ได้
3) ค้นพบแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมหรือเกษตรกรรมได้

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการในวารสารระดับนานาชาติ

1.7 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1.7.1 ชีววิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) เป็นองค์ประกอบในจีโนมมากกว่า 50 mol% ส่วนใหญ่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีความหลากหลายของลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา โดยแอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นกลุ่มของ แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการสร้างเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายเชื้อราและสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ แต่ไม่จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อรา เนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและมีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) แอคติโนแบคทีเรียจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการดำรงชีพอย่างอิสระ สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในระบบนิเวศที่เป็นแหล่งน้ำ (น้ำจืด และน้ำทะเล) และพื้นดิน ซึ่งส่วนใหญ่จะพบมากในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางธรรมชาติ โดยมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรือเชื้อราที่ตายแล้วในดิน ทำให้ระบบนิเวศในดินเกิดความสมดุล และมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารอาหารในธรรมชาติเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่อยู่ตลอดเวลา แอคติโนแบคทีเรียที่พบในดินส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มที่สร้างเส้นใยในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมักพบอยู่ในระยะพักตัวในลักษณะของสปอร์ แต่เมื่อมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สปอร์ก็จะมีการงอกสร้างเป็นเส้นใยขึ้นมา และจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัญฐานวิทยาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นต่อไป (Barka *et al*., 2016; Mayfield *et al*., 1972; Goodfellow & Williams, 1983)

1.7.2 อนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียจัดอยู่ใน Phylum *Actinobacteria* และ Class *Actinobacteria* ซึ่งประกอบด้วย 16 oders ได้แก่ *Actinomycetales*, *Actinopolysporales*, *Bifidobacteriales*, *Catenulisporales*, *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Corynebacteriales*, *Incertae sedis, Jiangellales*, *kineosporiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales*, *Streptospongiales* และ ซึ่งแบ่งตามการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rRNA (Gao and Gupta, 2012)

ในการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อการจัดจำแนกกลุ่มของแอคติโนแบคทีเรียประกอบด้วยการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนไทป์

การจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา (morphological classification) เป็นลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์อนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุล (genus) และสปีชีส์ (species) โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาประกอบด้วยลักษณะของเส้นใย (mycelial morphology)

ลักษณะของสายสปอร์ (spore chain morphology) การสร้างสารสี (pigment) ลักษณะของโคโลนี (colonial morphology) และขนาดเซลล์ (cell size) เป็นต้น (Labeda, 1987)

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic classification) เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มของแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุล ประกอบด้วย การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ การวิเคราะห์ลิพิด น้ำตาล กรดไขมัน และ menaquinone ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ และการวิเคราะห์เบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ เป็นต้น (Goodfellow and Minnikin, 1985; Williams *et al*., 1989)

การจัดจำแนกทางจีโนไทป์ (genotypic classification) เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียที่สนใจเทียบกับ type strains ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล และการวิเคราะห์ DNA-DNA hybridization สำหรับแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ (Kirby, 2011)

ดังนั้นวิธีการระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ของแอคติโนแบคทีเรีย จะต้องอาศัยการวิเคราะห์ลักษณะต่างๆร่วมกัน ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางจีโนไทป์ ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า “polyphasic taxonomy”

ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีการวิจัยเพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย และมีรายงานการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่หลายสปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 1-1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ส่วนมากแยกได้จากดิน นั่นแสดงให้เห็นว่าดินในประเทศไทยยังคงมีความอุดมสมบูรณ์และเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จำนวนมาก

1.7.3 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนแบคทีเรีย

ในปี 2005 นักวิจัยได้มีการรวบรวมข้อมูลของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์พบว่า สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นักวิจัยรู้จัก ณ ช่วงเวลานั้นมีอยู่ประมาณ 22,500 ชนิด ในจำนวนนี้ 10,100 ชนิด ได้ผลิตมาจากแอคติโนแบคทีเรีย จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่างแท้จริง (Berdy, 2005) (ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 1-1 แอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ที่คัดแยกได้จากประเทศไทย

แอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่	แหล่งของแอคติโนแบคทีเรีย	อ้างอิง
Actinomadura rayongensis	ดิน	Phongsopitanun *et al*., 2015
Actinomadura montaniterra	ดิน	Songsumanus *et al.*, 2016
Actinoplanes lichenis	ไลเคน	Phongsopitanun *et al.*, 2016
Dactylosporangium sucinum	ดิน	Phongsopitanun *et al*., 2014
Micromonospora chaiyaphumensis	ดิน	Jongrungruangchok *et al*., 2008
Micromonospora costi	พืช	Thawai, 2015
Micromonospora eburnea	ดิน	Thawai *et al*., 2005
Micromonospora fluostatini	ตะกอนดินจากป่าชายเลน	Phongsopitanun *et al*., 2015
Micromonospora sediminis	ตะกอนดินจากป่าชายเลน	Phongsopitanun *et al.*, 2016
Micromonospora siamensis	ดิน	Thawai et al., 2005
Micromonospora spongicola	ฟองน้ำทะเล	Supong *et al*., 2013
Nocardia rayongensis	ดิน	Tanasupawat *et al*., 2015
Nonomuraea monospora	ดิน	Nakaew *et al.*, 2012
Nonomuraea thailandensis	ดิน	Sripreechasak *et al*., 2013
Streptomyces andamanensis	ดิน	Sripreechasak *et al*., 2016
Streptomyces actinomycinicus	ดิน	Tanasupawat *et al*., 2016
Streptomyces chumphonensis	ตะกอนดินในทะเล	Phongsopitanun *et al*., 2014
Streptomyces phyllanthi	พืช	Klykleung *et al*., 2016
Streptomyces siamensis	ดิน	Sripreechasak *et al*., 2013
Streptomyces similanensis	ดิน	Sripreechasak *et al*., 2013
Streptomyces verrucosisporus	ตะกอนดินจากป่าชายเลน	Phongsopitanun *et al*., 2016
Verrucosispora andamanensis	ฟองน้ำทะเล	Supong *et al*., 2013

ตารางที่ 1-2 แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ (ดัดแปลงจาก Berdy, 2005)

แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ		
	ยาปฏิชีวนะ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ	รวม
แอคติโนแบคทีเรีย	8,700	1,400	10,100
แบคทีเรียอื่นๆ	2,900	900	3,800
เชื้อรา	4,900	3,700	8,600
รวม	16,500	6,000	22,500

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นยาปฏิชีวนะ สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียหลายชนิด และถูกนำมาใช้ในประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย นอกจากยาปฏิชีวนะแล้วแอคติโนแบคทีเรียยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อีกหลายชนิด เช่น ยาต้านเชื้อรา (antifungal agents) ยาต้านหนอนพยาธิ (anthelmintics) ยาต้านมะเร็ง (antitumor agents) เป็นต้น ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในทางการแพทย์สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1-3

นอกจากการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แอคติโนแบคทีเรียผลิตขึ้นยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้อีกด้วย เช่น ใช้เป็นยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช และยาฆ่าเชื้อราโรคพืช เป็นต้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนแบคทีเรียที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่

- สารในกลุ่ม Macrotetrolides เช่น tetranactin, dinactin และ trinactin ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยเฉพาะตัวไรของผลไม้และต้นชา ผลิตจาก *Streptomyces aureus* S-34666 (Ohshi *et al*., 1970; Ando *et al*., 1971; Misato, 1982)
- Mildiomycin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม nucleoside antibiotic ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรีย *Streptoverticillium rimofaciens* มีฤทธิ์ต้านโรคราแป้ง (powdery mildews) ที่ทำให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด (Harada & Kishi, 1978)
- Validamycin A ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของผักสวนครัว และต้นอ่อนของพืชหลายชนิด (Kameda, 1987)

- Kasugamycin ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces kasugaensis* ใช้ในการควบคุมโรคราในข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae cavara* นอกจากนี้ยังใช้ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas* ในธัญพืชชนิดอื่น ๆ (Umezawa, *et al*., 1965)
- Polymyxins ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราหลายชนิด โดย Polymyxin B ใช้ในการยับยั้งเชื้อราในผัก ผลไม้ และไม้ประดับ ส่วน Polymyxin D ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกาบใบแห้งของข้าว (rice sheath blight) (Isono *et al*., 1965; Endo & Misato, 1969; British Crop Protection Council, 1994)

การศึกษาวิจัยสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียในประเทศไทยนั้นมีน้อยมากเมื่อเทียบการศึกษาในพืชสมุนไพร ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทย เช่น สาร streptophenazine I ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC21835 เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (Bunbamrung *et al*, 2014) สาร samroiyotmycins A และ B ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC33756 มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา (Dramae *et al*., 2013) และสาร urdamycinone E, urdamycinone G และ dehydroxyaquayamycin ผลิตจาก *Streptomyces* sp. BCC45596 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* K1 และฤทธิ์ต้าน *Mycobacterium tuberculosis* (Supong *et al*., 2012) เป็นต้น ถึงแม้ว่าในประเทศไทยมีการค้นพบสารใหม่จากแอคติโนแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิด แต่ก็พบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ ซึ่งถ้าหากมีการศึกษาวิจัยทางด้านนี้มากขึ้น ก็อาจจะส่งผลให้มีการค้นพบสารชนิดใหม่ หรือสารทีมีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆที่น่าสนใจเกิดเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ ที่จะทำให้เกิดการค้นพบแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรีย ซึ่งนำไปสู่การค้นพบและพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคต่อ

ตารางที่ 1-3 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในทางการแพทย์

สาร	แอคติโนแบคทีเรีย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Actinomycin D	*Streptomyces* spp.	Antitumor antibiotic	Hollstein, 1974
Amphotericin B	*Streptomyces griseus*	Antifungal drug	Dutcher, 1968
Avermectin	*Streptomyces avermitilis*	Anthelmintic drug	Campbell, 2012
Chloramphenicol	*Streptomyces venezuelae*	Antibiotic	*West et al., 2012*
Daptomycin	*Streptomyces roseosporus*	Lipopeptide antibiotic	*Eisenstein et al., 2010*
Doxorubicin	*Streptomyces peucetius*	Anticancer drug	Lomovskaya *et al*., 1999
Erythromycin	*Streptomyces erythreus*	Antibiotic	Garrod, 1957
Fidaxomicin	*Dactylosporangium aurantiacum*	Macrocyclic antibiotic (specific to *Clostridium difficile*)	Venugopal & Johnson, 2011
Gentamicin	*Micromonospora purpurea*	Antibiotic	*Weinstein et al., 1963*
Neomycin	*Streptomyces fradiae*	Aminoglycoside antibiotic	Waksman, 1949
Novobiocin	*Streptomyces spheroides*	Antibiotic (antistaphylococcal agent, MRSA)	Sery *et al*., 1957
Nystatin	*Streptomyces noursei*	Antifungal drug	Espinel-Ingroff, 1996
Platensimycin	*Streptomyces platensis*	Antibiotic	Manallack *et al*., 2008
Rifamycin	*Amycolatopsis mediterranei*	Antibiotic (tuberculosis therapy)	Kim *et al*., 2006
Streptogramin A	*Streptomyces virginiae*	Antibiotic (against VRSA and VRE)	Mukhtar & Wright, 2005
Streptomycin	*Streptomyces griseus*	Antimycobacterial drug	Singh & Mitchison, 1954
Tetracycline	*Streptomyces aureofaciens*	Antibiotic	Nelson & Levy, 2011
Vancomycin	*Amycolatopsis orientalis*	Antibiotic	Donald, 2006

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือ

1) Autoclave
2) Centrifuge
3) Hot air oven
4) Incubating shaker
5) Biological safety cabinet
6) pH meter
7) Vortex mixer

2.1.2 อุปกรณ์

1) Autopipette
2) Beaker
3) Basket
4) Cylinder
5) Dropper
6) pH meter
7) Glass funnel
8) Glass rod
9) Laboratory bottle
10) Label
11) Loop
12) Microtube
13) Needle
14) Parafilm
15) Pestle and Mortar
16) Plastic bag

17) Screw cap tube
18) Spoon
19) Spreader
20) Test tube
21) Test tube rack
22) Autopipette Beaker
23) Basket
24) Cylinder
25) Dropper
26) pH meter
27) Glass funnel
28) Glass rod
29) Laboratory bottle
30) Loop
31) Micro tube
32) Needle
33) Parafilm
34) Pestle and Mortar
35) Plastic bag
36) Screw cap tube
37) Spoon
38) Spreader
39) Test tube
40) Test tube rack

2.1.3 สารเคมี

1) Agarose
2) Calcium carbonate ($CaCO_3$)
3) Casein
4) Cycloheximide
5) Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)

6) Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
7) Distilled water
8) DNTP
9) Ethanol (C_2H_5OH)
10) Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSo_4.7H_2O$)
11) Glucose
12) Hexane
13) Humic acid
14) Malt extract
15) Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSo_4.7H_2O$)
16) Nalidixic acid
17) Potassium chloride (KCl)
18) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
19) Potassium nitrate (KNO_3)
20) Sodium chloride (NaCl)
21) Sodium hydroxide (NaOH)
22) Yeast extract

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Humic vitamin agar (HV)
2) Mueller hinton agar (MHA)
3) Starch casein nitrate agar (SCN)
4) Yeast extract-malt extract agar (ISP2 agar)
5) Yeast extract-malt extract broth (ISP2 broth)
6) Yeast mold agar (YM)

3.1.5 เชื้อจุลชีพทดสอบ

1) *Bacillus subtilis* ATCC 6633
2) *Candida albicans* ATCC 10231
3) *Escherichia coli* ATCC 25922
4) *Micrococcus luteus* ATCC 9341

5) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

6) *Staphylococcus aureus* ATCC25923

2.2 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณรอบๆ พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จำนวน 15 ตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส หลังจากอบนาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างดินมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด และคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียในอาหารจำเพาะ humic vitamin agar (HVA) และ starch casein nitrate agar (SCN) จากนั้นทำการเก็บรักษาแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาด้วยกระบวนการแช่แข็งใน 20% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุลโดยการการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA

2.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP2 โดยวิธี streak plate method และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 14 วัน หลังจากเชื้อเจริญบนอาหารแข็งนำไปศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง โดยการบันทึก สีของโคโลนี (colony) สีของเส้นใยอาหาร (substrate mucelia) และสีของรงควัตถุ (soluble pigment) ที่สร้างในอาหาร เทียบกับแผ่นสีมาตรฐาน (The NBS/IBCC color System) รวมถึงศึกษาลักษณะของเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลานาน 3-5 วัน จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วนำมาสกัด DNA โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) หลังจากนั้นนำ DNA ที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler ตามวิธีการของ Suriyachadkun และคณะ (2009) เพื่อเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ universal primers คือ 27F และ 1392R นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบ โดยวิธี gel electrophoresis เพื่อดูแถบของยีน 16S rRNA จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยวิธี capillary standard sanger sequencing (MACROGEN, Korea) และนำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่วิเคราะห์ได้ของแต่ละไอโซเลทเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่มีในฐานข้อมูลออนไลน์ EzBiocould (http://www.ezbiocloud.net; Yoon และคณะ, 2017) โดยวิธี

Basic Local Alignment Tool (BLAST) เพื่อระบุสกุลของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการสร้าง phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ซึ่งใช้ซอร์ฟแวร์ MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016)

2.4 การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น

2.4.1 การผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ

เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยบนเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 9 วัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar well diffusion

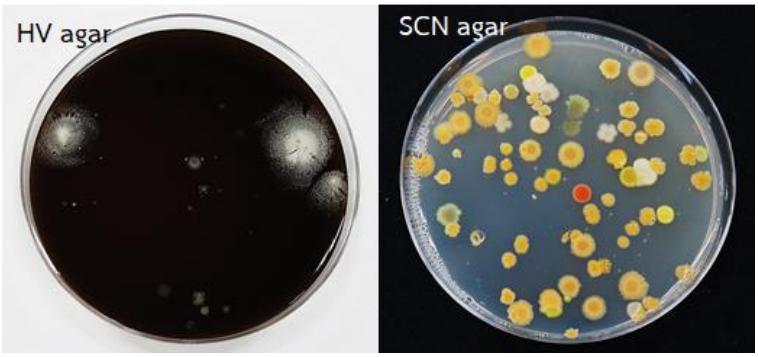
2.4.2 การทดทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar well diffusion

เชื้อจุลชีพทดสอบที่ใช้ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทำได้โดยนำเชื้อทดสอบเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MHA และ YM สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับแบคทีเรีย) และ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับยีสต์) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้มาละลายในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) และปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 และ 2.0 McFarland สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ และนำเชื้อจุลชีพทดสอบมาเกลี่ยบนอาหาร MHA (สำหรับแบคทีเรีย) และ YM (สำหรับยีสต์) โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (stiriled cotton swab) จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเจาะอาหารบนแข็ง MHA และ YM ที่ได้เกลี่ยเชื้อไว้ให้เป็นหลุม แล้วหยดเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิลิตร ในการทดสอบใช้ยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ amphotericin B เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และอาหารเหลว ISP2 เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรีย และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)

3.1 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณ พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างดินบริเวณห้วยกุ่ม 4 ตัวอย่าง ได้แก่ KK01, KK02, KK03 และ KK04 อย่างดินบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระจำนวน 6 อย่าง ได้แก่ KK05, KK06, KK07, KK08, KK09 และ KK10 และดินบริเวณน้ำตกชันตาเถร ได้แก่ KK11, KK12, KK13, KK14 และ KK15 โดยดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.9-8.2 ดังแสดงในตารางที่ 3-1 จะเห็นได้ว่าตัวอย่าดินที่นำมาแยกแอคติโนแบคทีเรียนั้นส่วนใหญ่จะมีค่า pH ค่อนข้างเป็นกรดอ่อน การเตรียมตัวอย่างดินก่อนนำมาแยกแอคติโนแบคทีเรียโดยการตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิและนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกก่อนการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย จากการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียโดยใช้อาหารคัดเลือก (selective media) 2 ชนิด คือ humic vitamin agar (HV) และ starch casein nitrate agar (SCN) (รูปที่ 3-1) ผลการทดลองพบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 132 ไอโซเลท (ตารางที่ 3-2) ประกอบด้วยแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดิน KK01 จำนวน 8 ไอโซเลท KK02 จำนวน 8 ไอโซเลท KK03 จำนวน 15 ไอโซเลท KK04 จำนวน 10 ไอโซเลท KK05 จำนวน 15 ไอโซเลท KK06 จำนวน 11 ไอโซเลท KK07 จำนวน 7 ไอโซเลท KK08 จำนวน 7 ไอโซเลท (KK08-1, KK08-6, KK08-10, KK08-13, KK08-17, KK08-22 และ KK08-23) KK09 จำนวน 12 ไอโซเลท KK10 จำนวน 2 ไอโซเลท KK11 จำนวน 14 ไอโซเลท KK12 จำนวน 5 ไอโซเลท KK13 จำนวน 5 ไอโซเลท KK14 จำนวน 6 ไอโซเลท และ KK15 จำนวน 7 ไอโซเลท (ภาพที่ 3-2)



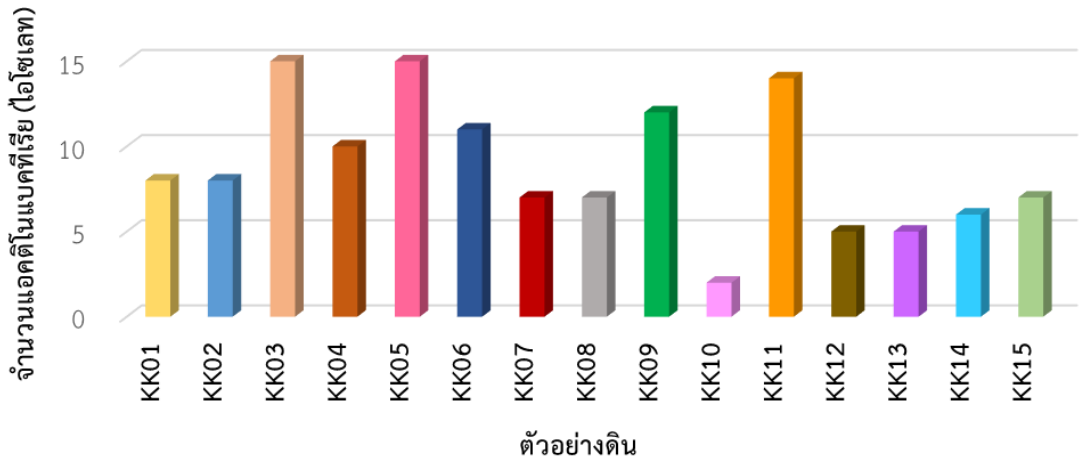
รูปที่ 3-1 การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารคัดแยกเชื้อ

ตารางที่ 3-1 ค่า pH ของตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณ พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ สำหรับคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

ตัวอย่างดิน	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH ของตัวอย่างดิน
KK01	ห้วยกุ่ม	6.4
KK02	ห้วยกุ่ม	6.6
KK03	ห้วยกุ่ม	7.0
KK04	ห้วยกุ่ม	8.2
KK05	อ่างเก็บน้ำบางพระ	7.3
KK06	อ่างเก็บน้ำบางพระ	5.9
KK07	อ่างเก็บน้ำบางพระ	6.5
KK08	อ่างเก็บน้ำบางพระ	6.2
KK09	อ่างเก็บน้ำบางพระ	6.5
KK10	อ่างเก็บน้ำบางพระ	6.9
KK11	น้ำตกชันตาเถร	6.4
KK12	น้ำตกชันตาเถร	6.6
KK13	น้ำตกชันตาเถร	7.0
KK14	น้ำตกชันตาเถร	6.3
KK015	น้ำตกชันตาเถร	6.5

ตารางที่ 3-2 ตัวอย่างดินและแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จำนวน 132 ไอโซเลท

ตัวอย่างดิน	จำนวนแอคติโนแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	ไอโซเลท
KK01	8	KK01-6, KK01-8, KK01-9, KK01-10, KK01-11, KK01-13, KK01-14, KK01-16
KK02	8	KK02-2, KK02-4, KK02-6, KK02-7, KK02-11, KK02-12, KK02-13, KK02-15
KK03	15	KK03-2, KK03-14, KK03-16, KK03-17, KK03-18, KK03-22, KK03-24, KK03-25, KK03-26, KK03-27, KK03-30, KK03-31, KK03-33, KK03-35, KK03-38
KK04	10	KK04-2, KK04-3, KK04-5, KK04-6, KK04-7, KK04-9, KK04-10, KK04-11, KK04-12, KK04-13
KK05	15	KK05-3, KK05-4, KK05-7, KK05-8, KK05-11, KK05-12, KK05-13, KK05-15, KK05-17, KK05-18, KK05-19, KK05-23, KK05-24, KK05-25, KK05-27
KK06	11	KK06-4, KK06-7, KK06-9, KK06-11, KK06-13, KK06-20, KK06-22, KK06-23, KK06-24, KK06-29, KK06-31
KK07	7	KK07-1, KK07-2, KK07-12, KK07-15, KK07-20, KK07-21, KK07-25
KK08	7	KK08-1, KK08-6, KK08-10, KK08-13, KK08-17, KK08-22, KK08-23
KK09	12	KK09-1, KK09-3, KK09-5, KK09-8, KK09-9, KK09-10, KK09-11, KK09-12, KK09-13, KK09-14, KK09-15, KK09-19
KK10	2	KK10-10, KK10-15
KK11	14	KK11-1, KK11-4, KK11-5, KK11-6, KK11-7, KK11-8, KK11-9, KK11-10, KK11-11, KK11-12, KK11-13, KK11-14, KK11-15, KK11-17
KK12	5	KK12-4, KK12-5, KK12-7, KK12-8, KK12-9
KK13	5	KK13-2, KK13-4, KK13-5, KK13-6, KK13-7
KK14	6	KK14-2, KK14-3, KK14-4, KK14-6, KK14-7, KK14-9
KK015	7	KK15-1, KK15-2, KK15-3, KK15-6, KK15-7, KK15-8, KK15-9



ภาพที่ 3-2 จำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนแบคทีเรีย

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

การศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อจัดจำแนกในระดับสกุลของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง ISP2 ซึ่งประกอบด้วยการสร้างและลักษณะของเส้นใยอากาศ สีโคโลนี สีเส้นใยอาหาร และสีรงควัตถุที่สร้างแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 132 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 3-3) ได้แก่ *Streptomyces, Nocardia, Micromonospora, Nonomurarea* และ *Actinomadura*

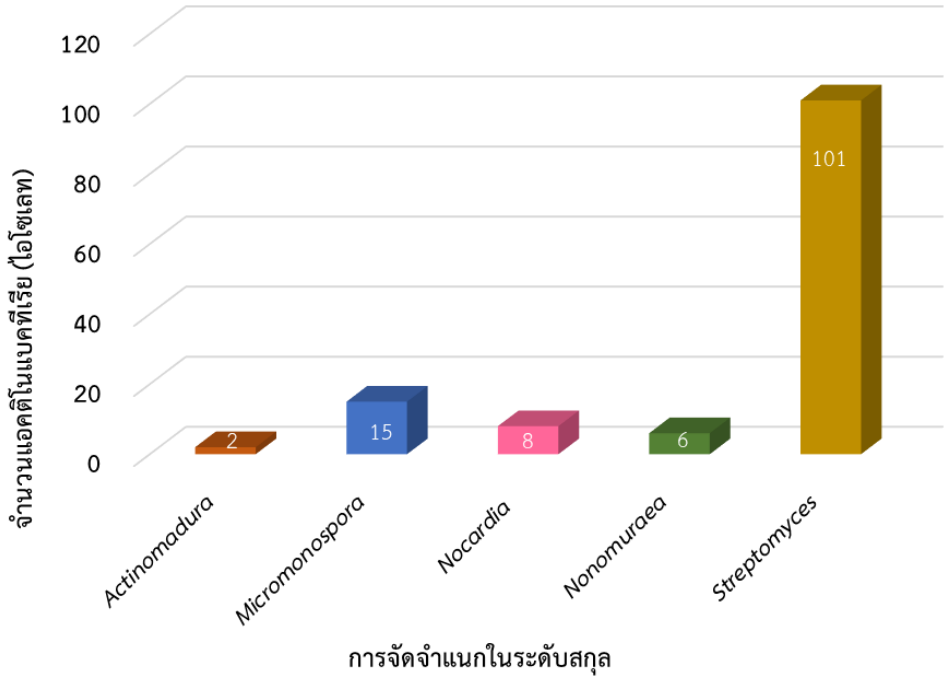
กลุ่มที่ 1 มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท (1.5%) แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการสร้างสายสปอร์เป็นสายสั้น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายกับตะขอ (hook) บนเส้นใยอากาศ และไม่มีการแตกหักของเส้นใยอาหาร จากข้อมูลสัณฐานทางวิทยาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 5 มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Actinomadura* ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Actinomadura*

กลุ่มที่ 2 มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท (4.5%) แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการสร้างสายสปอร์เป็นสายสั้น ๆ ทั้งแบบเกลียวสั้น หรือแบบสปอร์เดี่ยว และไม่มีการแตกหักของเส้นใยอาหาร จากข้อมูลสัณฐานทางวิทยาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Nonomurarea* ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Nonomurarea*

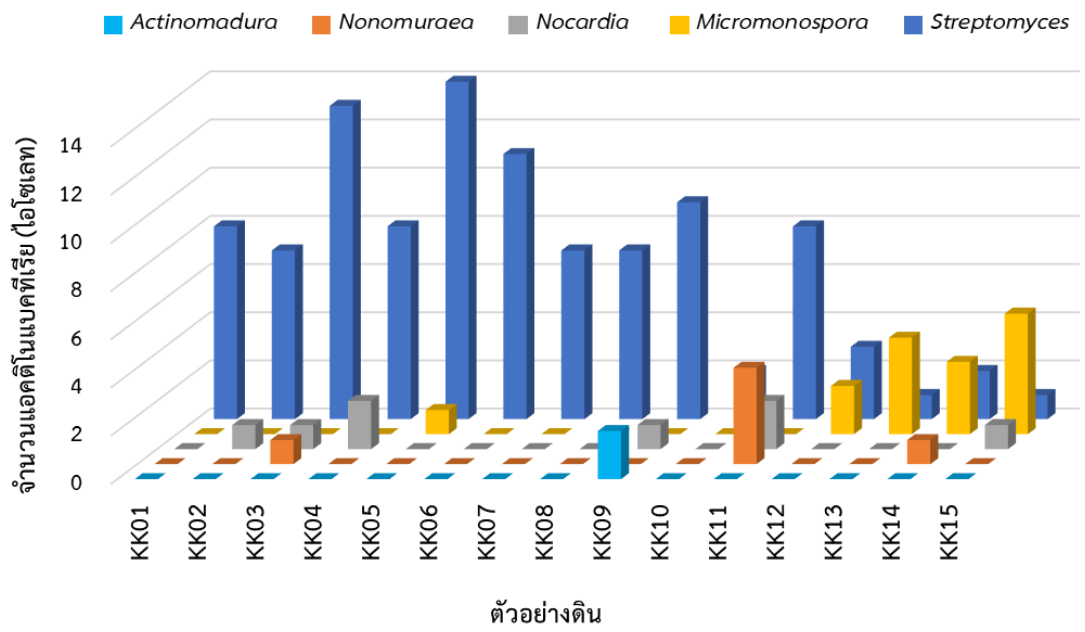
กลุ่มที่ 3 มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลท (6.1%) แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการสร้างสายสปอร์เป็นสายสั้นบนเส้นใยอากาศ และมีการแตกหักของเส้นใยอาหาร จากข้อมูลสัณฐานทางวิทยาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardia* ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Nocardia*

กลุ่มที่ 4 มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลท (11.4%) แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการสร้างสปอร์แบบสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร และไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ จากข้อมูลทางสัณฐานทางวิทยาดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Micromonospora* ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 5 เป็นแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีจำนวน 101 ไอโซเลท (76.5%) แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างเส้นใยอากาศจำนวนมากที่พัฒนาไปเป็นสายสปอร์ (spore chains) ซึ่งมีหลากหลายรูปแบบ เช่น แบบเกลียวคล้ายสปริง (spiral) ลูป (loop) หรือเส้นตรง (straight) และไม่พบการแตกหักของเส้นใยอาหาร จากข้อมูลทางสัณฐานทางวิทยาแสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ดังนั้น แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Streptomyces*



ภาพที่ 3-3 กราฟแสดงจำนวนแอคติโนแบคทีเรียแต่สกุลที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน

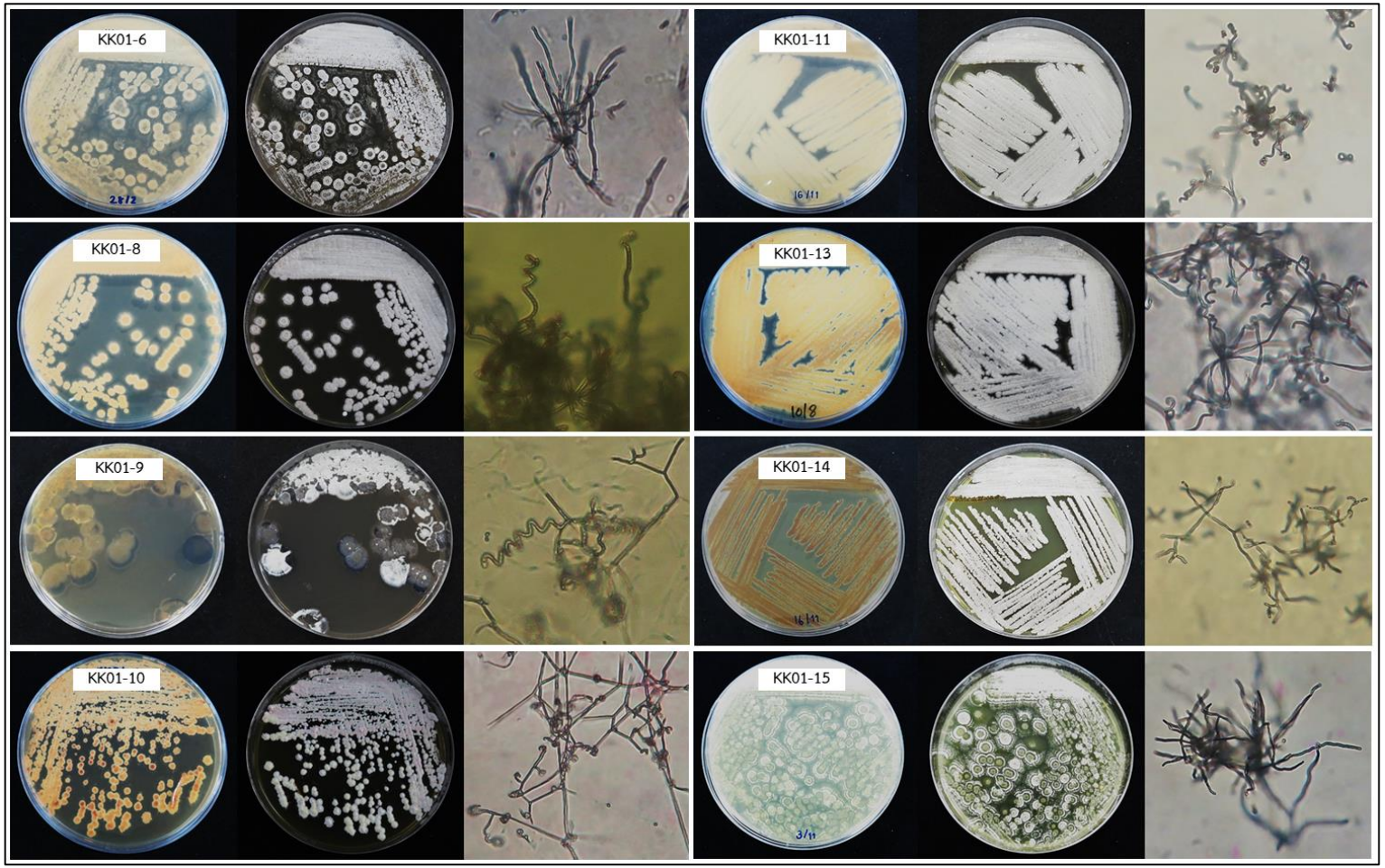


ภาพที่ 3-4 กราฟแสดงความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น หากพิจารณาถึงความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุลที่พบในแต่ละตัวอย่างดิน พบว่า ตัวอย่างดิน KK03, KK09, KK11, KK14 และ KK15 พบความหลากหลายในระดับสกุลมากที่สุด ซึ่งพบแอคติโนแบคทีเรียถึง 3 สกุล และตัวอย่างดิน KK02, KK04, KK05, KK12 และ KK13 พบแอคติโนแบคทีเรีย 2 สกุล ในขณะที่ตัวอย่างดิน KK01, KK06, KK07 และ KK08 พบเฉพาะแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* เท่านั้น (ตารางที่ 3-3 ถึง 3-18 ภาพที่ 3-5 ถึง 3-19) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างดินดังกล่าวไม่พบความหลากทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุล

ตารางที่ 3-3 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

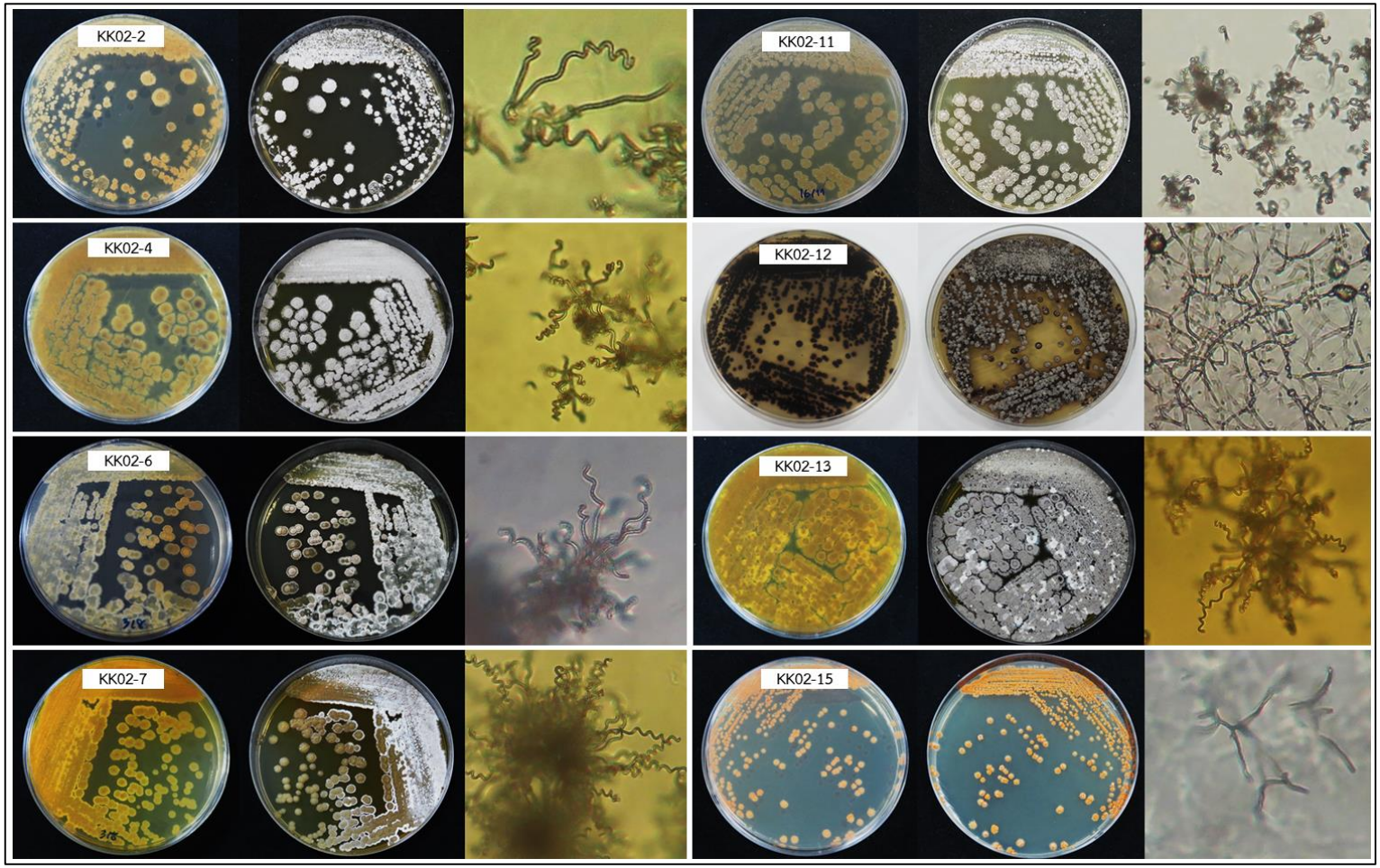
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK01-6	Abundant, straight	Yellowish gray	Moderate greenish yellow	None	*Streptomyces*
KK01-8	Abundant, spiral	Light bluish gray-white	Pale yellow	None	*Streptomyces*
KK01-9	Moderate, spiral	Pale blue	Grayish olive	Grayish yellowish brown	*Streptomyces*
KK01-10	Abundant, spiral	Pinkish white-pale pink	Pale yellow-strong yellow	None	*Streptomyces*
KK01-11	Abundant, spiral	Medium gray	Moderate olive	None	*Streptomyces*
KK01-13	Abundant, spiral	Yellowish gray	Vivid greenish yellow	None	*Streptomyces*
KK01-14	Abundant, straight	Light gray	Moderate brown	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK01-16	Abundant, straight	Greenish white	Grayish greenish yellow	None	*Streptomyces*



ภาพที่ 3-5 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK01 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-4 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK02-2	Abundant, spiral	Light bluish gray	Light orange brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK02-4	Abundant, spiral	Light bluish gray	Strong yellowish brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK02-6	Abundant, open loop	Medium gray	Dark grayish yellow	None	*Streptomyces*
KK02-7	Abundant, spiral	Bluish gray	Light olive brown	Light olive brown	*Streptomyces*
KK02-11	Abundant, spiral	Yellowish gray	Dark grayish yellow	Grayish yellow	*Streptomyces*
KK02-12	Abundant, unknown	Light brownish gray - light gray	Olive black	Dark grayish yellow	*Streptomyces*
KK02-13	Abundant, spiral	White - bluish gray	Moderate brwon	Deep yellow	*Streptomyces*
KK02-15	Abundant, short	Vivid orange	Strong orange yellow	None	*Nocardia*



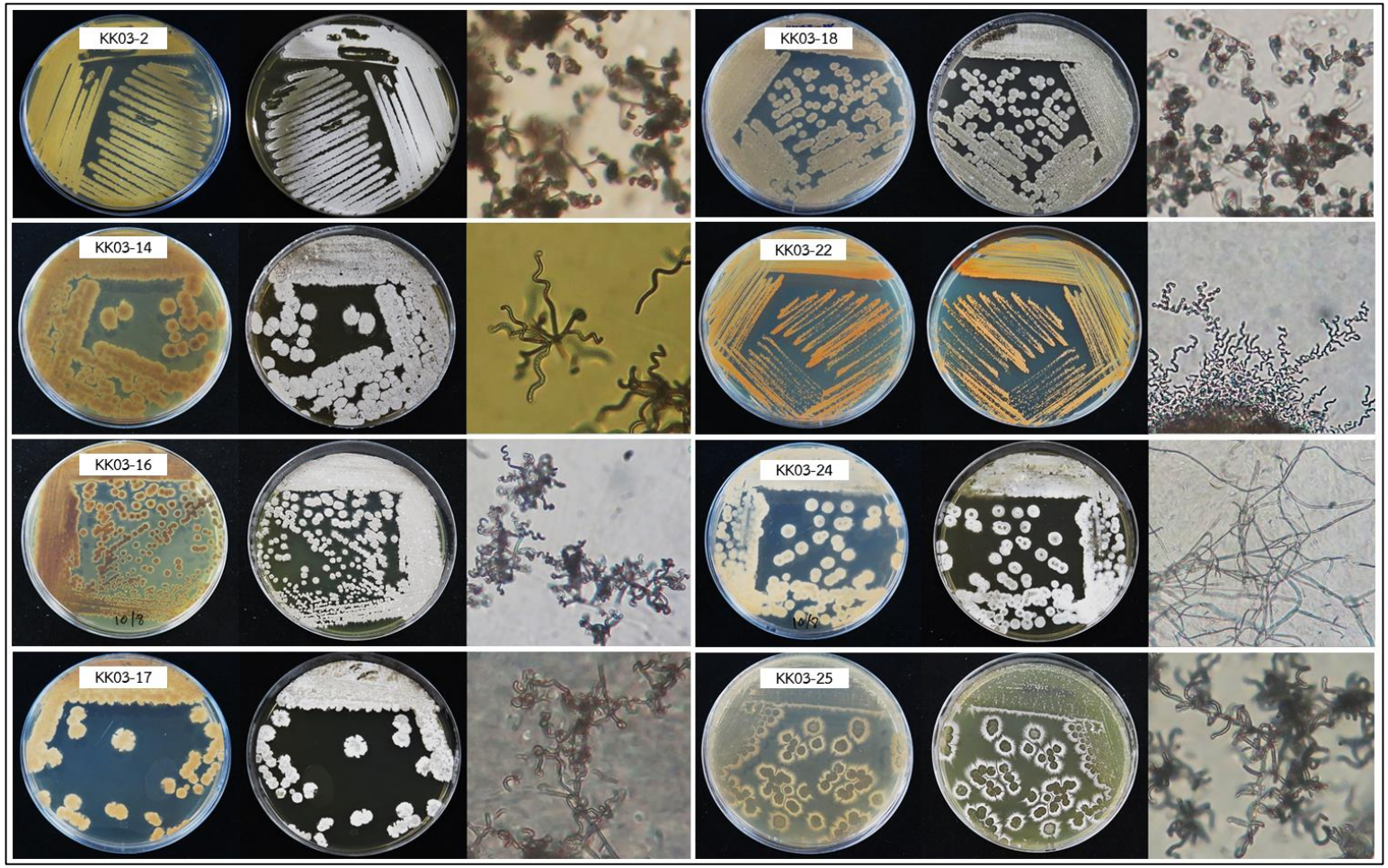
ภาพที่ 3-6 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK02 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-5 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK03 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

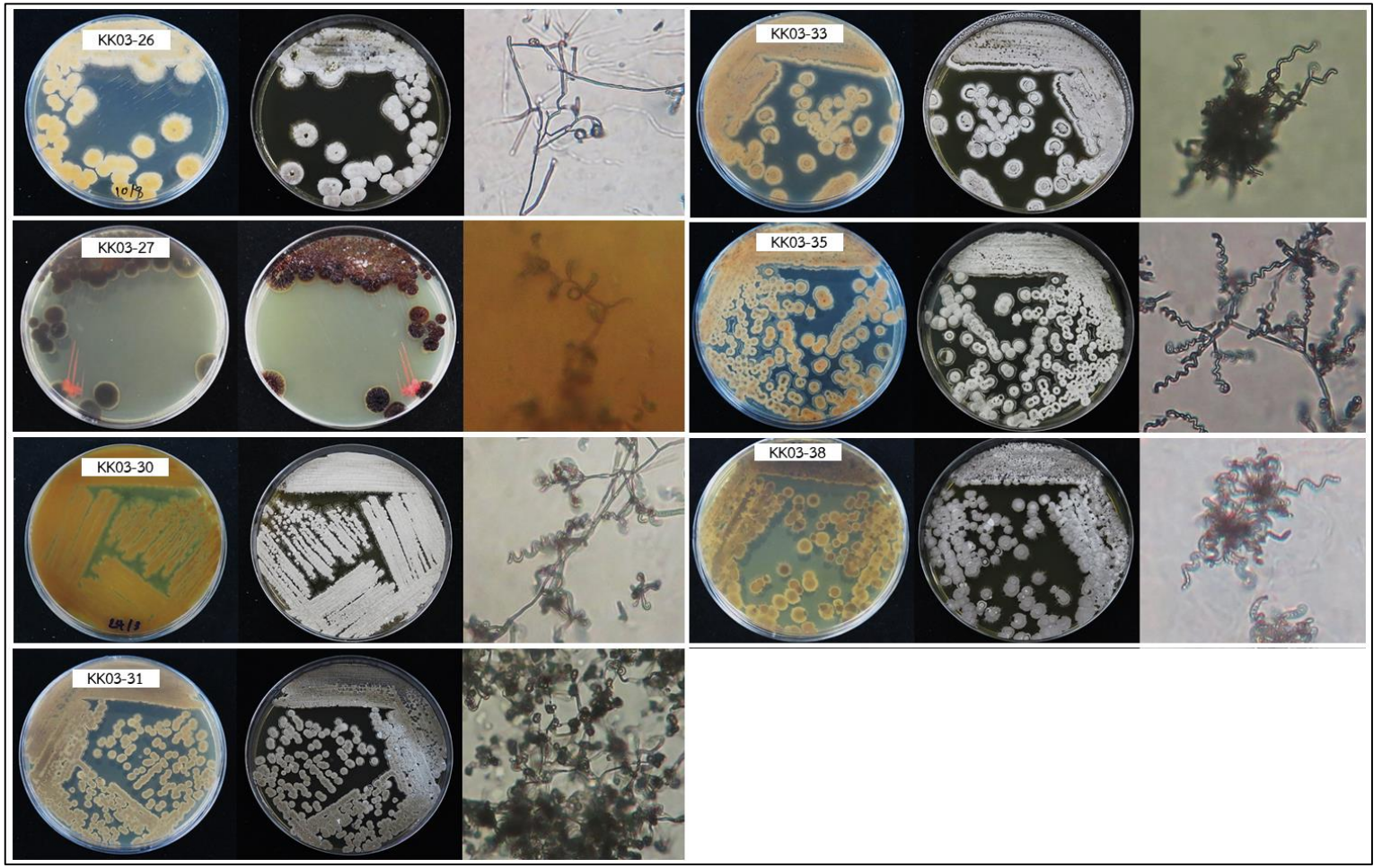
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK03-2	Abundant, spiral	White-light bluish gray	Light olive	Stroxng greenish yellow	*Streptomyces*
KK03-14	Abundant, open loop	Dark bluish gray	Grayish brown	Light olive brown	*Streptomyces*
KK03-16	Abundant, spiral	Medium gray	Grayish yellowish brown	None	*Streptomyces*
KK03-17	Abundant, spiral	White-light bluish gray	Dark yellow	Light yellow	*Streptomyces*
KK03-18	Abundant, spiral	White-bluish gray	Moderate olive-grayish greenish yellow	Moderate yellow	*Streptomyces*
KK03-22	Moderate, short	Vivid orange	Strong yellow	None	*Nocardia*
KK03-24	Abundant, straight	Light olive gray-light greenish yellow	Light yellow	Moderate yellow	*Streptomyces*
KK03-25	Abundant, short	Pale yellowish green	Pale yellowish green	None	*Streptomyces*
KK03-26	Abundant, straight	Yellowish gray	Grayish yellow	None	*Streptomyces*
KK03-27	Rare, short	Moderate brown-deep brown	Brownish gray	None	*Nonomuraea*
KK03-30	Abundant, spiral	Medium gray	Moderate olive brown	Light olive brown	*Streptomyces*
KK03-31	Abundant, spiral	Light olive gray-light bluish gray	Moderate olive	Dark grayish yellow	*Streptomyces*

ตารางที่ 3-5 (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK03-33	Abundant, open loop	Light gray-medium gray	Moderate olive	Light yellow	*Streptomyces*
KK03-35	Abundant, spiral	White-light bluish gray	Light olive	None	*Streptomyces*
KK03-38	Abundant, open loop	Bluish gray-bluish white	Grayish olive	Dark yellow	*Streptomyces*



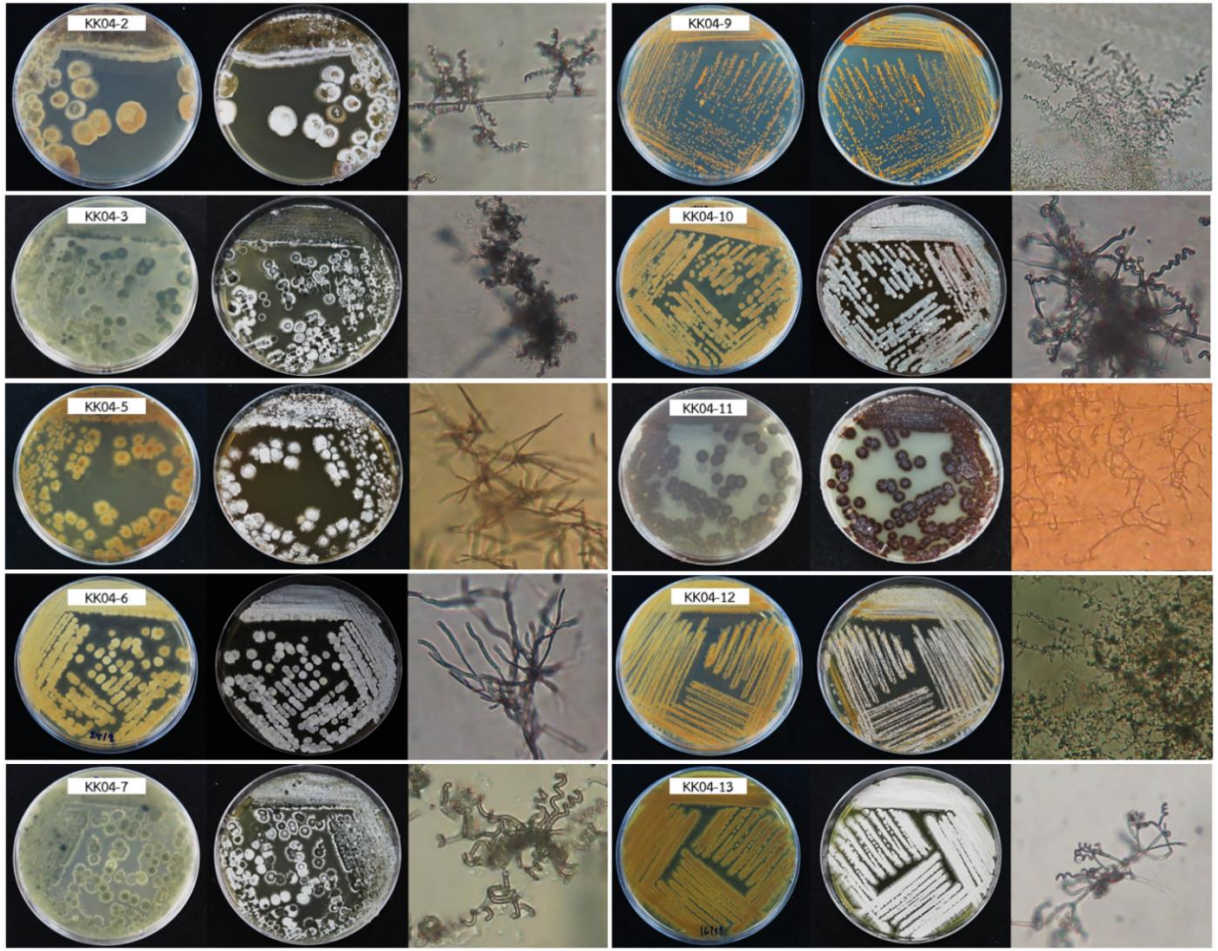
ภาพที่ 3-7 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK03



ภาพที่ 3-7 (ต่อ)

ตารางที่ 3-6 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

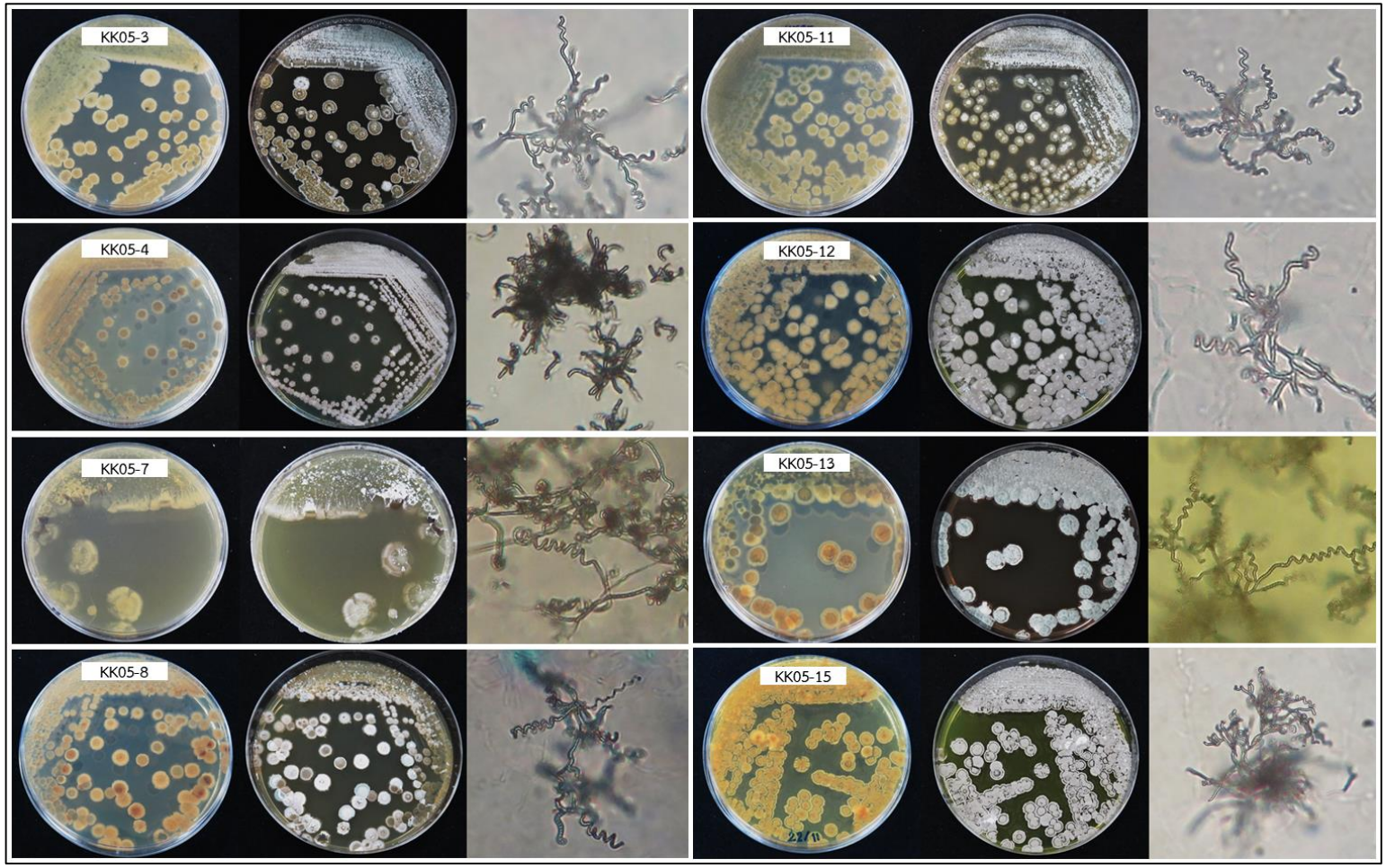
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK04-2	Abundant, spiral	Bluish gray-light olive brown	Dark yellow	None	*Streptomyces*
KK04-3	Abundant, spiral	Moderate orange yellow	Vivid orange yellow	None	*Streptomyces*
KK04-5	Abundant, straight	Light gray-medium gray	Moderate olive brown	Strong yellowish brown	*Streptomyces*
KK04-6	Abundant, straight	Light gray	Pale yellow-light yellow	None	*Streptomyces*
KK04-7	Abundant, open loop	Greenish gray grayish blue	Grayish green	Light grayish olive	*Streptomyces*
KK04-9	Rare, short chain	Brilliant orange yellow	Brilliant orange yellow	None	*Nocardia*
KK04-10	Abundant, spiral	Bluish gray-dark bluish gray	Moderate olive	Dark greenish yellow	*Streptomyces*
KK04-11	Abundant, unknown	Dark brown	Dark grayish brown	None	*Streptomyces*
KK04-12	Rare, short chain	Moderate orange yellow	Vivid orange yellow	Vivid greenish yellow	*Nocardia*
KK04-13	Abundant, spiral	Medium gray	Moderate olive brown	Light greenish yellow	*Streptomyces*



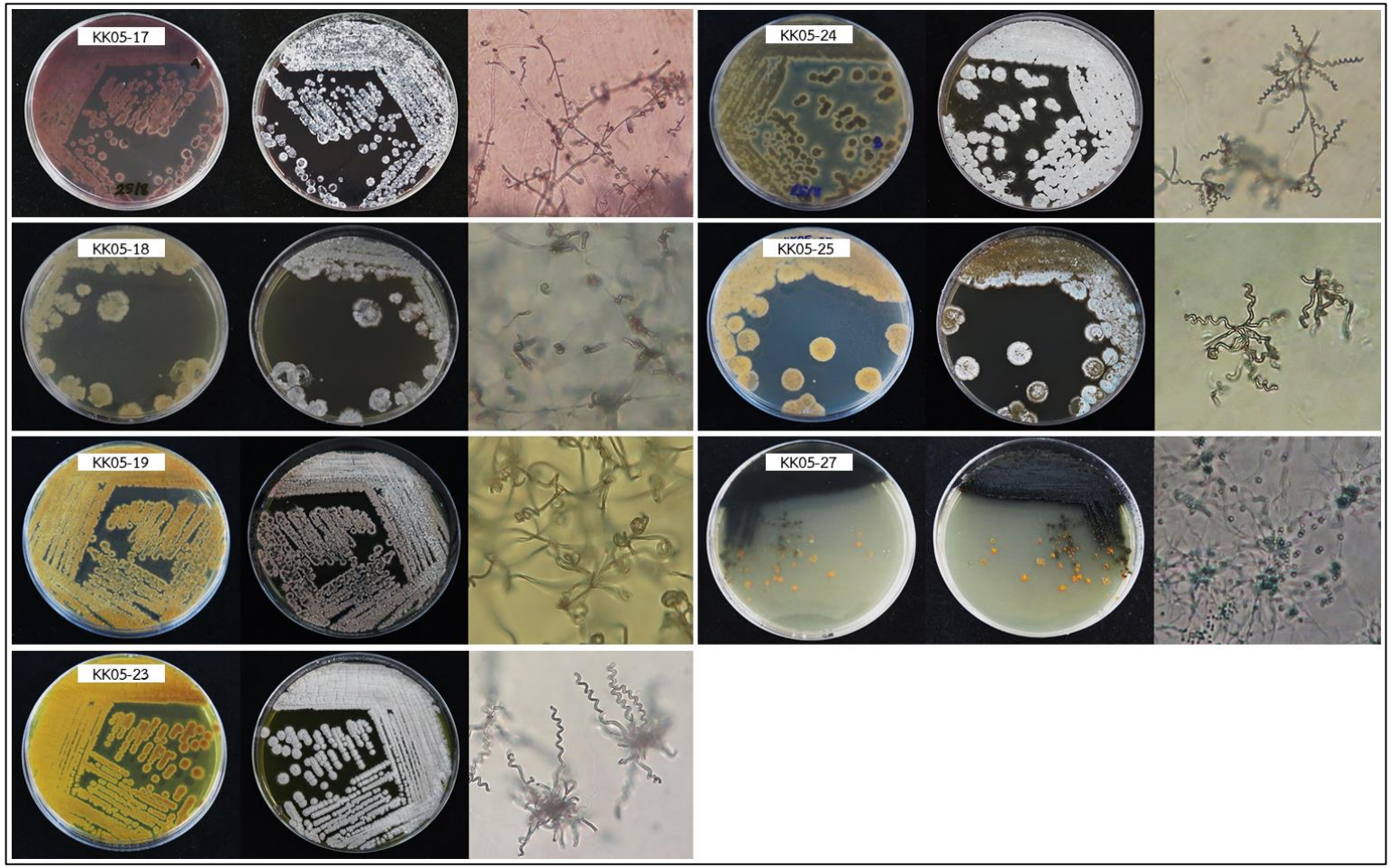
ภาพที่ 3-8 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK04 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-7 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK05 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK05-3	Abundant, spiral	Pale blue-light bluish gray	Grayish olive green	Moderate greenish yellow	*Streptomyces*
KK05-4	Abundant, flexous	Light bluish gray-bluish gray	Dark greenish gray	None	*Streptomyces*
KK05-7	Abundant, spiral	Light bluish gray-bluish gray	Dark greenish gray	Light Yellow	*Streptomyces*
KK05-8	Abundant, spiral	Bluish white-bluish gray	Light olive brown	Moderate yellow	*Streptomyces*
KK05-11	Abundant, spiral	Greenish gray	Grayish olive green	Deep greenish yellow	*Streptomyces*
KK05-12	Abundant, open loop	Pale blue-bluish gray	Light olive	Brilliant greenish yellow	*Streptomyces*
KK05-13	Abundant, spiral	Pale blue	Dark grayish yellow-dark grayish olive	None	*Streptomyces*
KK05-15	Abundant, spiral	Pinkish gray-bluish gray	Grayish yellowish brown	Brownish gray	*Streptomyces*
KK05-17	Abundant, spiral	Greenish white-light greenish gray	Grayish purple	Pale purple	*Streptomyces*
KK05-18	Abundant, spiral	White	Dark grayish yellow	Moderate yellow	*Streptomyces*
KK05-19	Abundant, open loop	Grayish reddish orange	Strong yellowish brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK05-23	Abundant, spiral	Dark gray	Moderate olive brown	Deep yellow	*Streptomyces*
KK05-24	Abundant, spiral	Bluish gray	Dark grayish olive	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK05-25	Abundant, spiral	Pale blue-moderate olive green	Light olive	Moderate greenish yellow	*Streptomyces*
KK05-27	None	Vivid orange & olive black	Black	None	*Micromonospora*



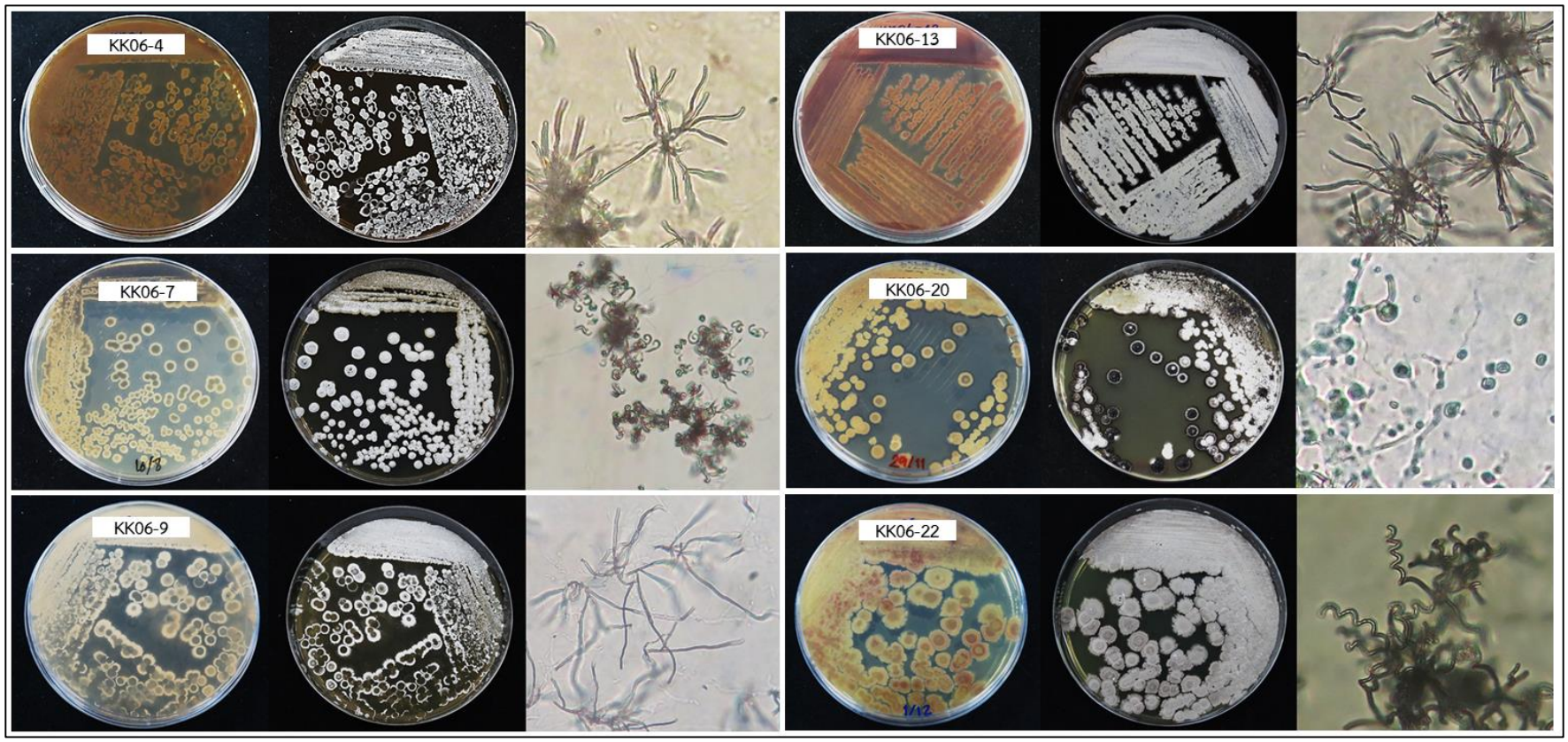
ภาพที่ 3-9 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK05 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



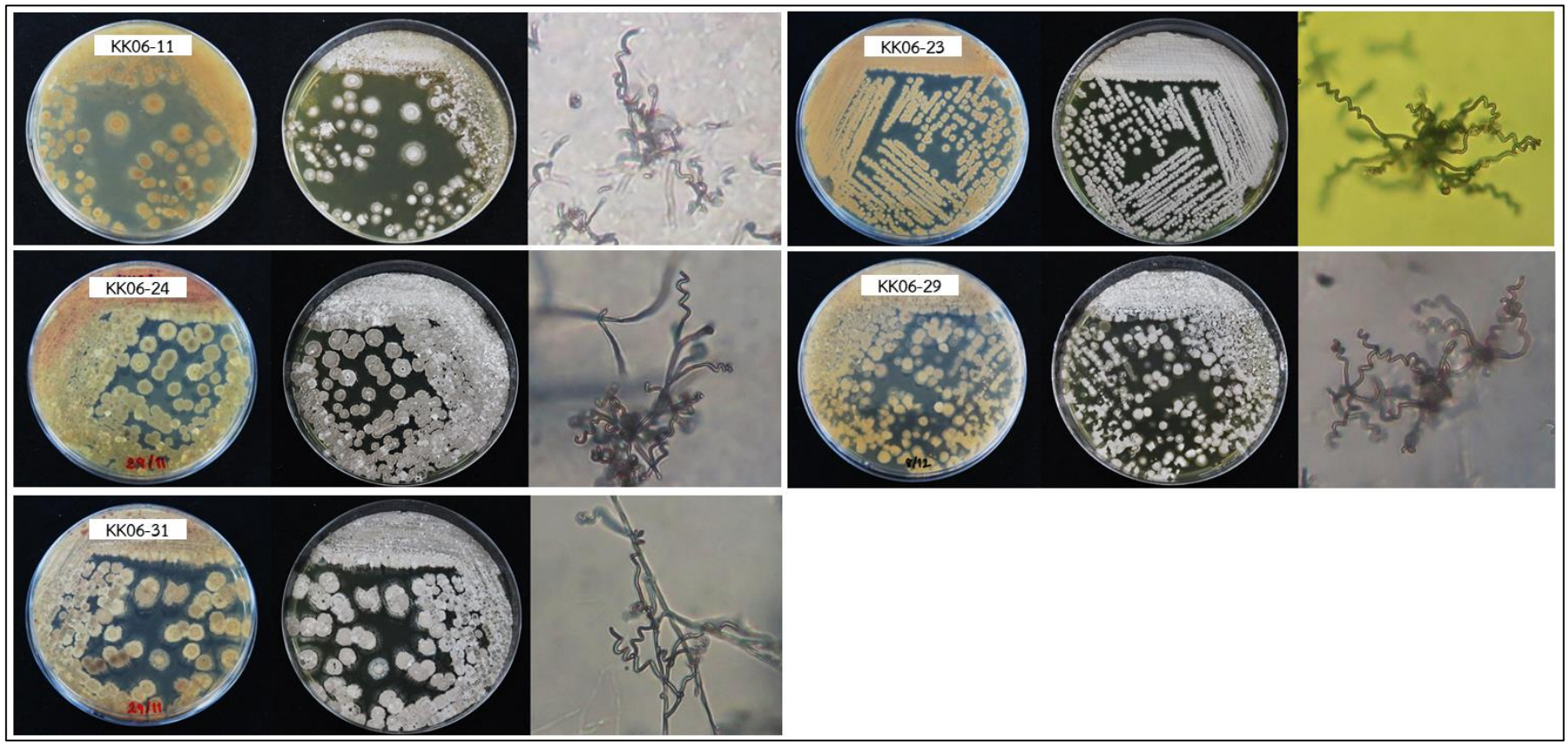
ภาพที่ 3-9 (ต่อ)

ตารางที่ 3-8 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK06 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK06-4	Abundant, straight	Bluish gray	Moderate brown	Strong brown	*Streptomyces*
KK06-7	Abundant, open loops	Dark bluish gray	Grayish olive green	None	*Streptomyces*
KK06-9	Abundant, straight	White	Light yellow	Dark greenish yellow	*Streptomyces*
KK06-11	Abundant, open loop	Light bluish gray	Moderate yellowish brown	Vivid greenish yellow	*Streptomyces*
KK06-13	Abundant, straight	Light gray-deep reddish purple	Grayish red	Brownish orange	*Streptomyces*
KK06-20	Abundant, spiral	Light gray-black	Moderate yellowish brown-dark yellowish brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK06-22	Abundant, spiral	Mediumgray-dark gray	Light yellow-strong yellow brown	None	*Streptomyces*
KK06-23	Abundant, spiral	Light gray-dark gray	Deep yellow	Vivid greenish yellow	*Streptomyces*
KK06-24	Abundant, spiral	Medium gray	Grayish olive	None	*Streptomyces*
KK06-29	Abundant, spiral	Medium gray	Moderate olive	None	*Streptomyces*
KK06-31	Abundant, spiral	Medium gray	Light olive	None	*Streptomyces*



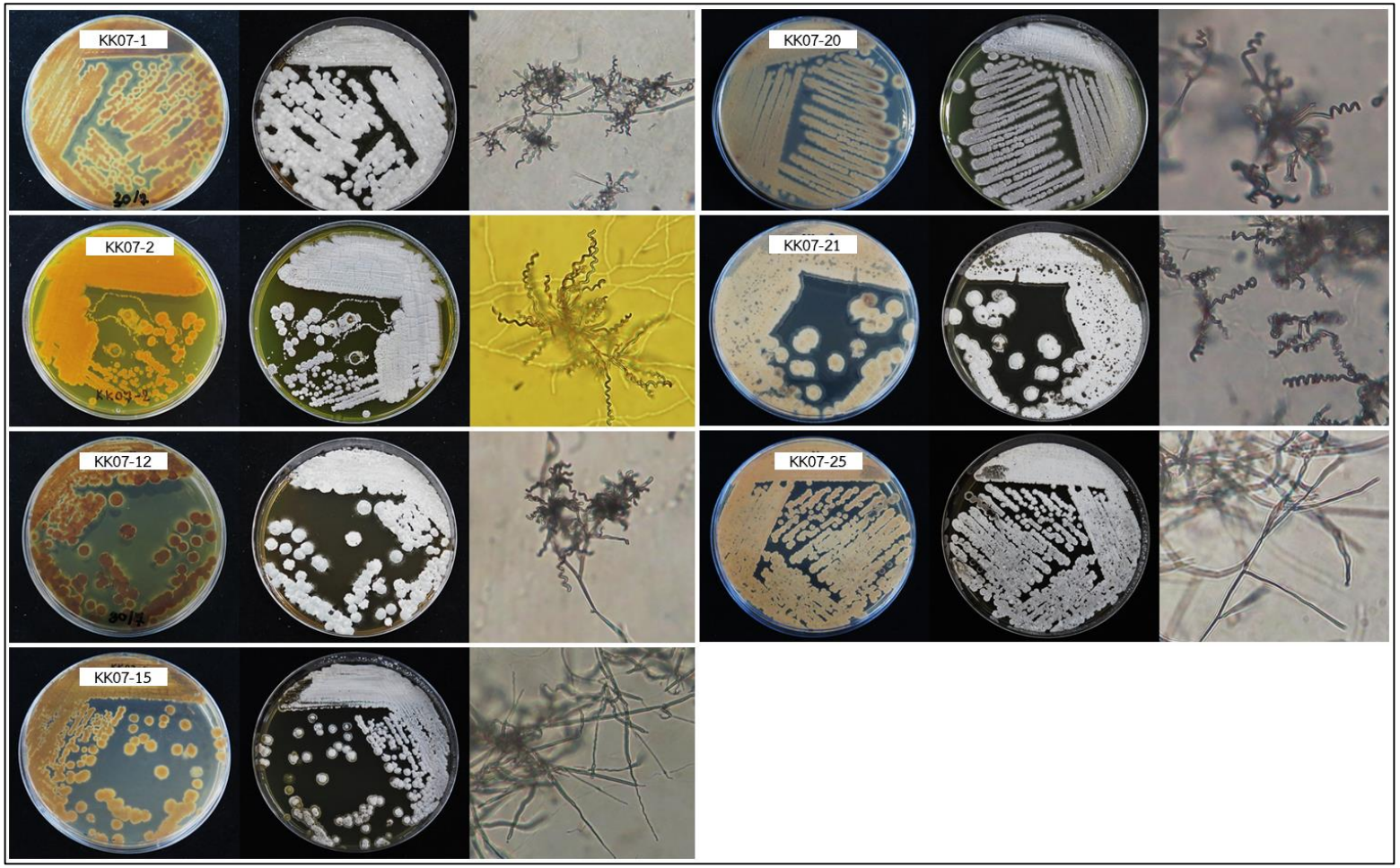
ภาพที่ 3-10 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK06 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-10 (ต่อ)

ตารางที่ 3-9 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK07 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

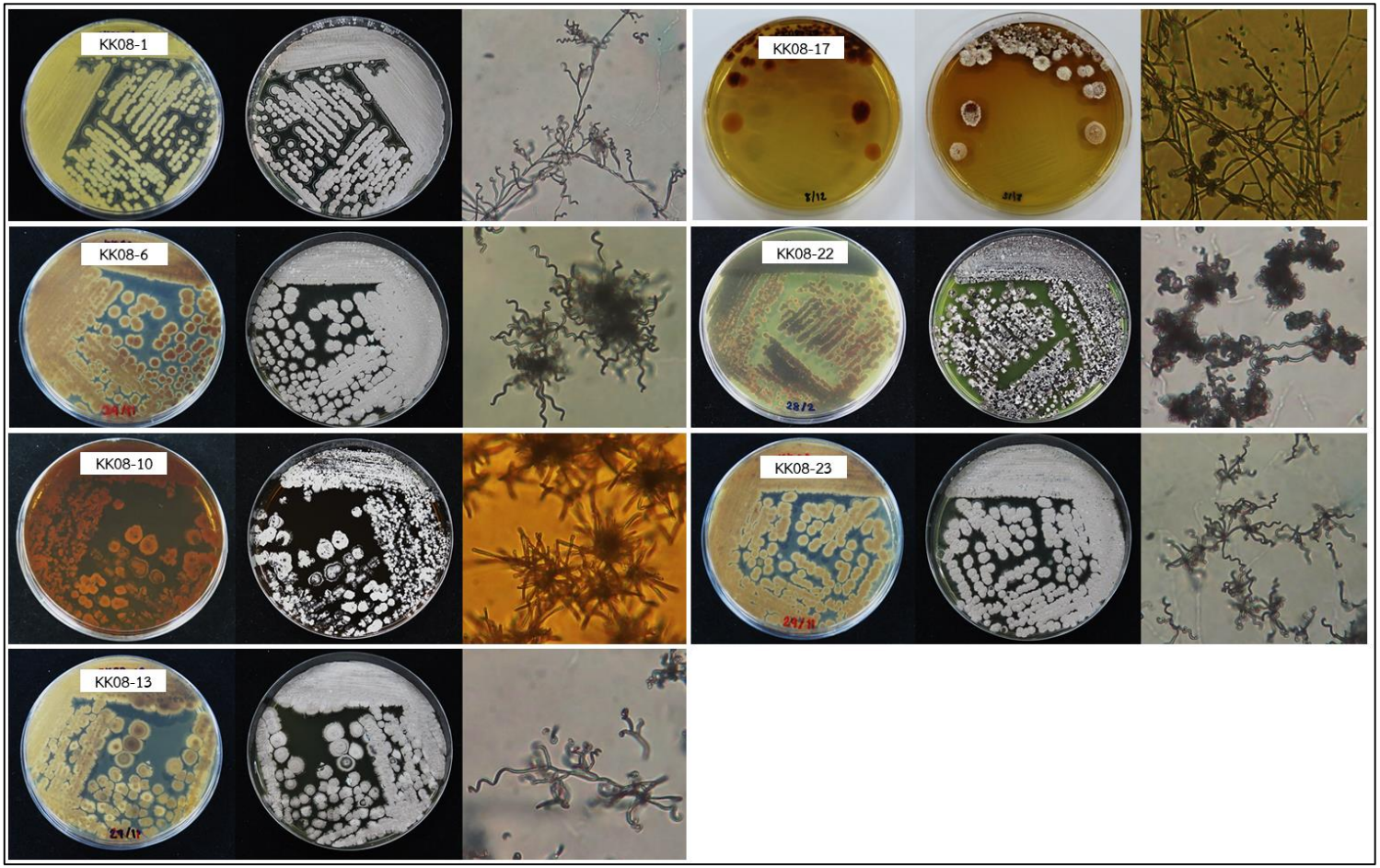
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK07-1	Abundant, spiral	Bluish gray-grayish blue	Dark greenish yellow-strong greenish yellow	Light yellow	*Streptomyces*
KK07-2	Abundant, spiral	Light blusih gray-blushish gray	Dark olive yellow	Vivid greenish yellow	*Streptomyces*
KK07-12	Abundant, spiral	Light bluish gray-pale blue	Grayish brown	Brilliant orange	*Streptomyces*
KK07-15	Abundant, straight	Light bluish gray-dark yellow	Deep yellow	Light yellow	*Streptomyces*
KK07-20	Abundant, spiral	Light gray-medium gray	Grayish yellow-dark grayish yellow	Strong greenish yellow	*Streptomyces*
KK07-21	Abundant, spiral	Pale blue-dark grayish yellowish brown	Moderate yellowish brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK07-25	Abundant, straight	White-medium gray	Deep yellow	Dark yellow	*Streptomyces*



ภาพที่ 3-11 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK07 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-10 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK08 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

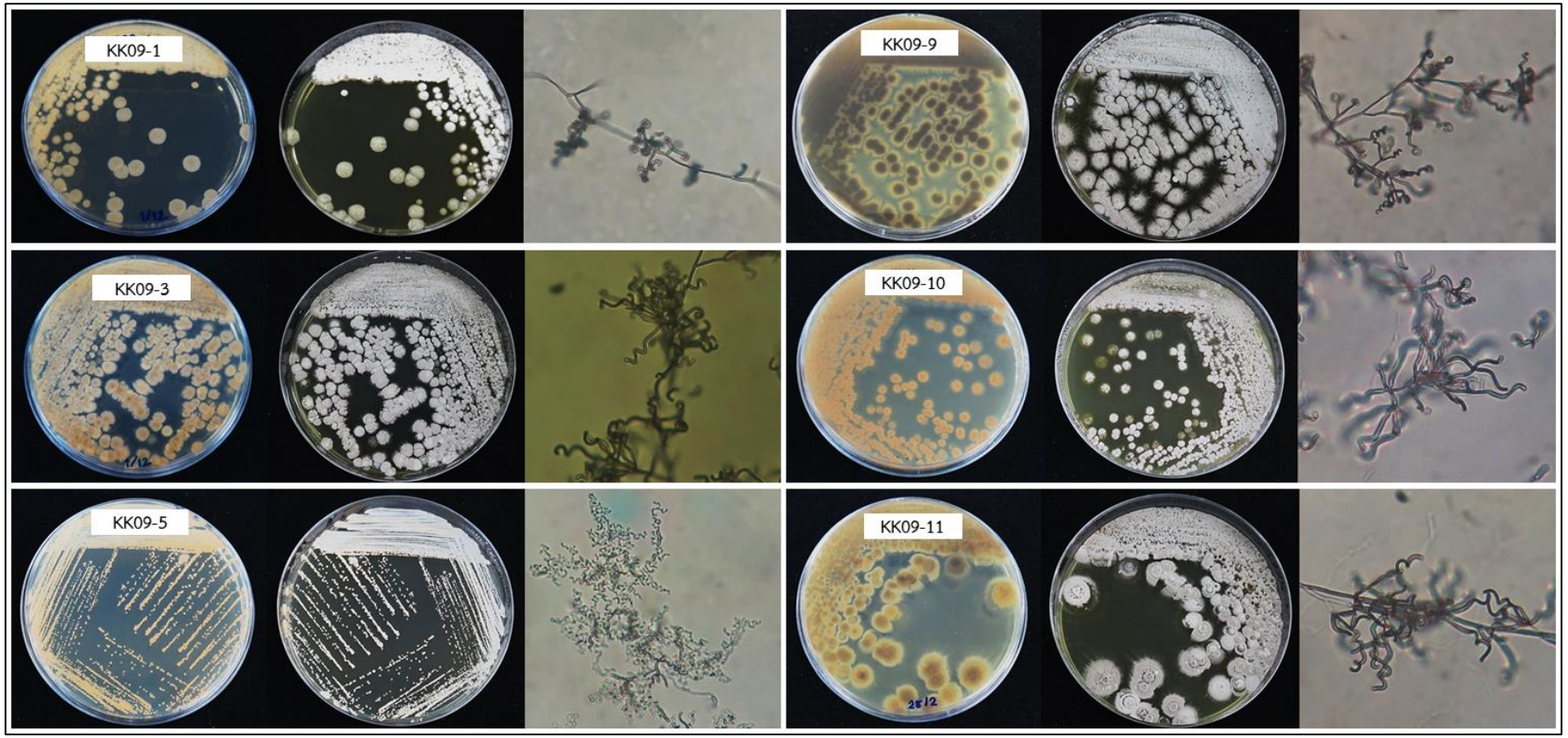
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK08-1	Abundant, spiral	Dark gray	Grayish olive	Strong greenish yellow	*Streptomyces*
KK08-6	Abundant, open loop	Medium gray	Brownish gray	None	*Streptomyces*
KK08-10	Abundant, straight	Medium gray	Deep brown	Moderate brown	*Streptomyces*
KK08-13	Abundant, open loop	Light bluish gray	Moderate olive	Light yellow	*Streptomyces*
KK08-17	Abundant, spiral	Pinkish gray-light brownish gray	Strong reddish brown	Brilliant orange	*Streptomyces*
KK08-22	Abundant, spiral	Dark gray-light gray	Brownish black	Light olive	*Streptomyces*
KK08-23	Abundant, open loop	Medium gray	Moderate yellowish brown	None	*Streptomyces*



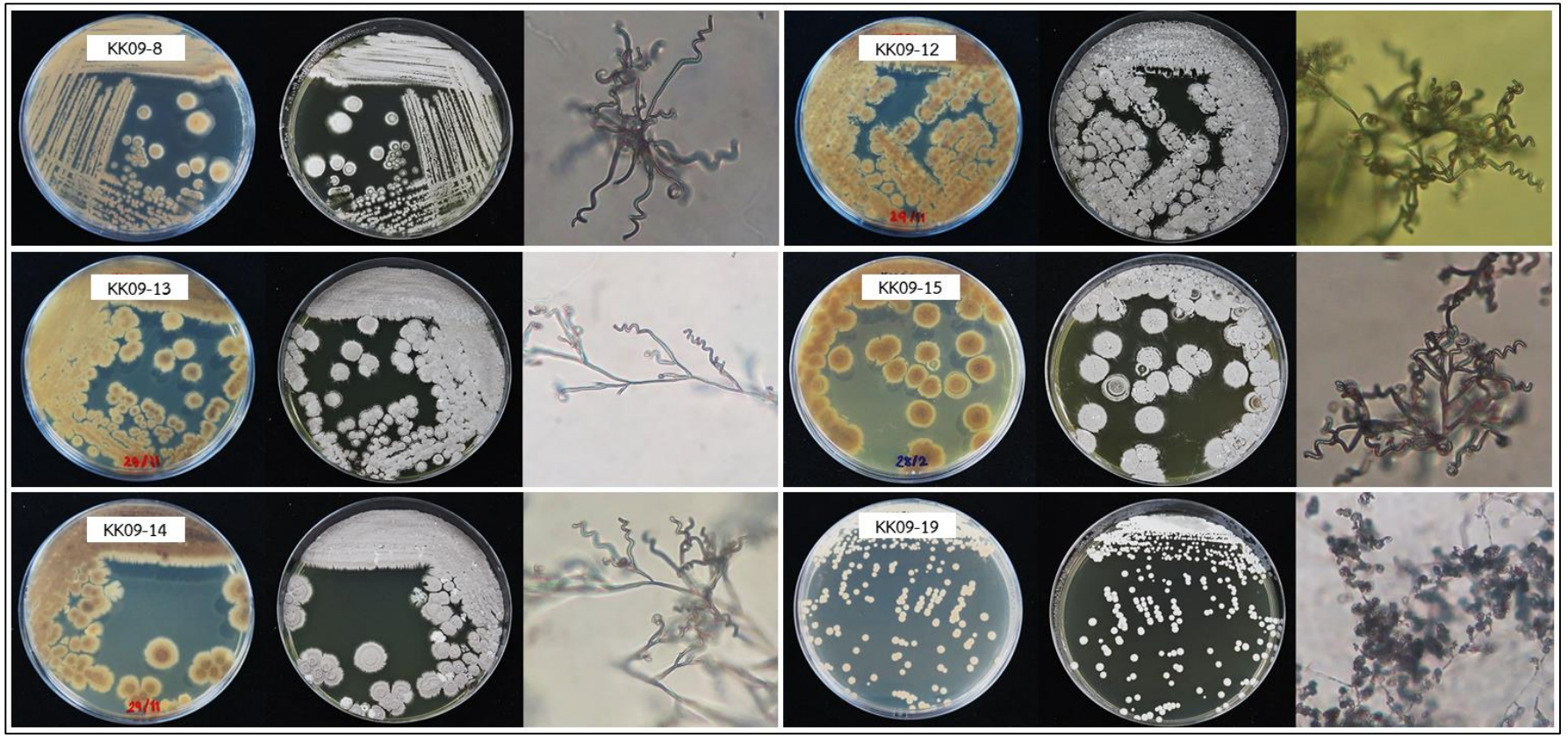
ภาพที่ 3-12 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK08 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-11 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK09 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK09-1	Moderate, hook	White	Moderate greenish yellow	None	*Actinomadura*
KK09-3	Abundant, open loop	Bluish gray	Moderate olive	None	*Streptomyces*
KK09-5	Rare, short chain	Pale yellowish pink	Moderate yellow	None	*Nocardia*
KK09-8	Abundant, open loop	Light bluish gray-medium gray	Dark grayish yellow	None	*Streptomyces*
KK09-9	Abundant, spiral	Medium gray	Moderate olive	Dark greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-10	Abundant, flexous	Yellowish gray	Dark yellow	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-11	Abundant, open loop	Light bluish gray	Light yellow-dark yellow	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-12	Abundant, spiral	Medium gray	Light bluish gray	Strong greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-13	Abundant, spiral	Bluish gray	Moderate olive	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-14	Abundant, open loop	Medium gray	Grayish olive	None	*Streptomyces*
KK09-15	Abundant, spiral	Light bluish gray	Moderate olive brown	Light greenish yellow	*Streptomyces*
KK09-19	Abundant, hook	White	Strong greenish yellow	Light yellow	*Actinomadura*



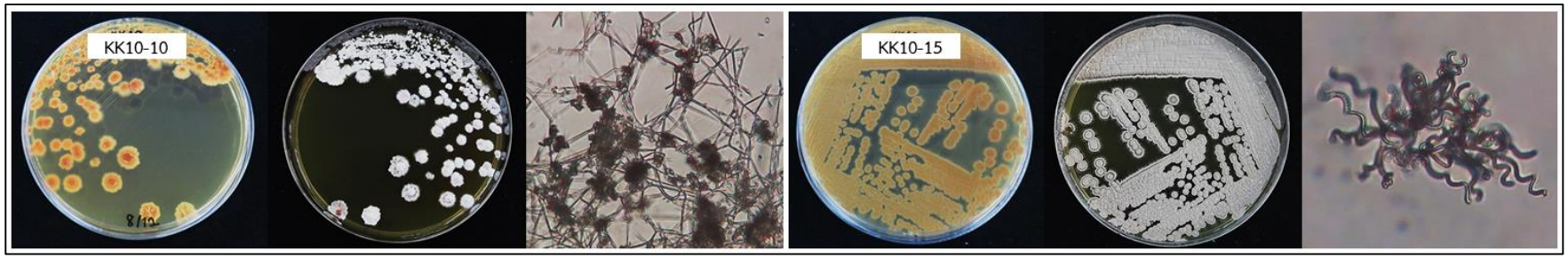
ภาพที่ 3-13 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK09 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-13 (ต่อ)

ตารางที่ 3-12 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK10 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

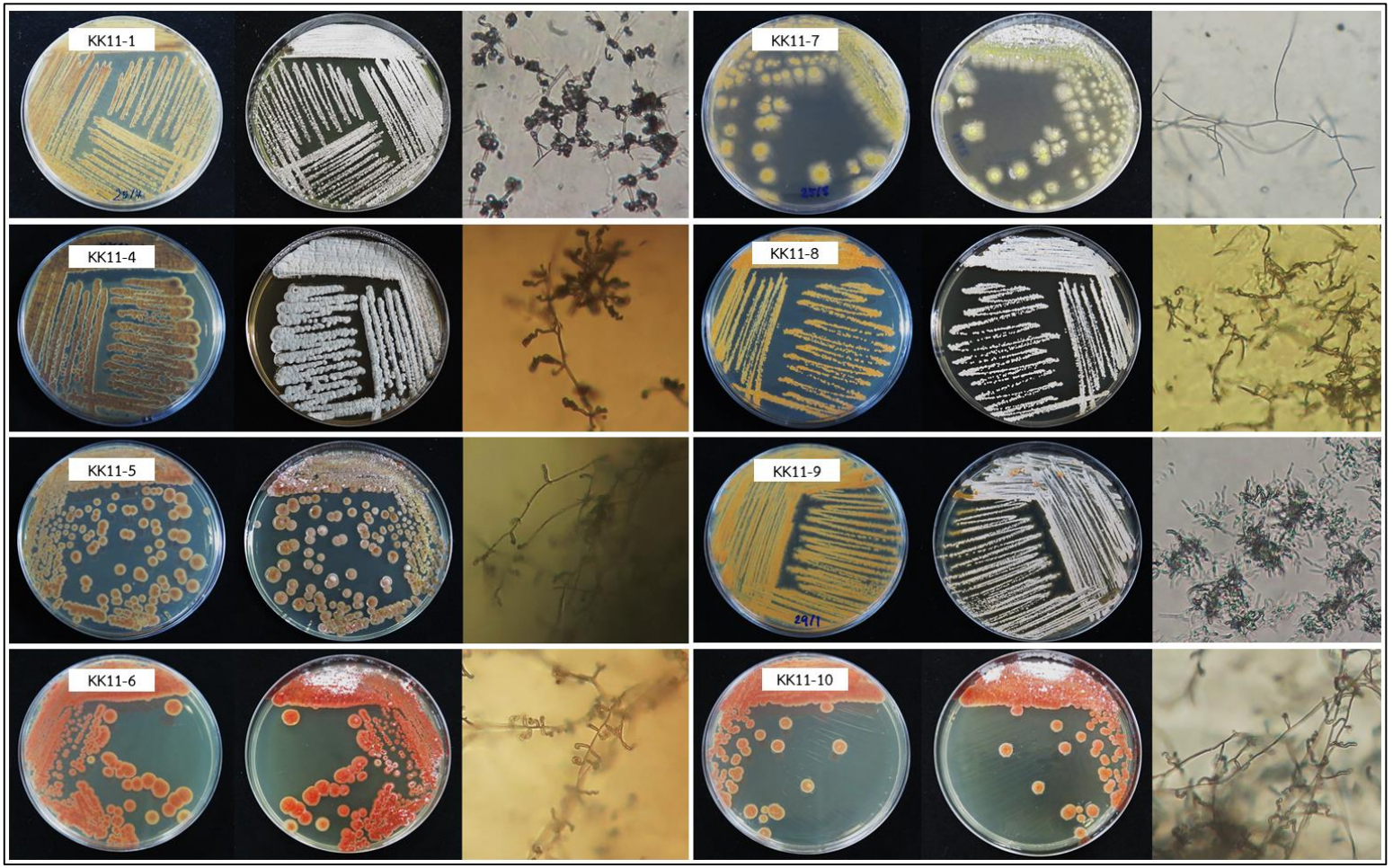
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK10-10	Abundant, spiral	White-grayish purplish pink	Deep orange	Light olive brown	*Streptomyces*
KK10-15	Abundant, open loop	Bluish gray-dark bluish gray	Moderate olive brown	Dark orange yellow	*Streptomyces*



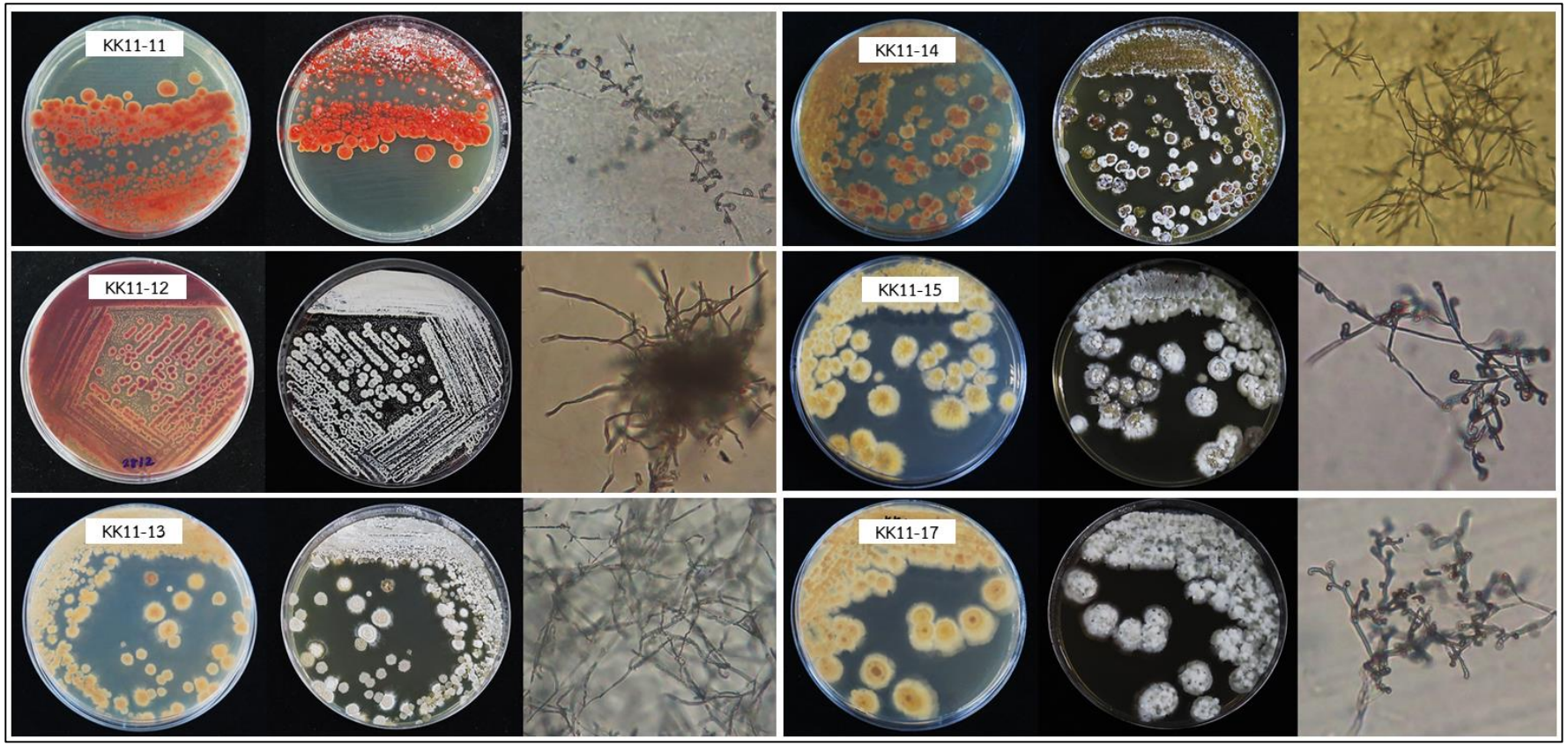
ภาพที่ 3-14 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK010 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-13 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK11 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK11-1	Abundant, spiral	Light bluish gray-medium gray	Moderate olive brown	None	*Streptomyces*
KK11-4	Abundant, spiral	Light greenish gray	Dark yellow	Moderate yellow	*Streptomyces*
KK11-5	Moderate, hook	Grayish yellow-moderate yellow	Moderate yellow	None	*Nonomuraea*
KK11-6	Moderate, hook	Vivid reddish orange	Vivid orange	Light yellow	*Nonomuraea*
KK11-7	Abundant, straight	Light yellow	Light yellow-light greenish yellow	None	*Streptomyces*
KK11-8	Moderate, short	Light yellowish pink	Strong orange yellow	None	*Nocardia*
KK11-9	Moderate, short	Light orange	Strong orange yellow	None	*Nocardia*
KK11-10	Moderate, short	Moderate orange yellow-strong orange yellow	Light orange yellow-strong orange yellow	Light yellow	*Nonomuraea*
KK11-11	Moderate, short	Vivid orange	Vivid orange	None	*Nonomuraea*
KK11-12	Abundant, straight	Yellowish gray-dark grayish yellow	Dark yellow	None	*Streptomyces*
KK11-13	Abundant, straight	Yellowish gray-dark grayish yellow	Dark yellow	None	*Streptomyces*
KK11-14	Abundant, straight	Light gray & deep greenish yellow-moderate olive brown	Dark yellow-strong yellowish brown	Brilliant greenish yellow	*Streptomyces*
KK11-15	Abundant, spiral	Greenish white-grayish yellowish green	Yellowish white-brilliant yellow	None	*Streptomyces*
KK11-17	Abundant, spiral	Greenish white-light greenish gray	Pale yellow-moderate yellow	None	*Streptomyces*



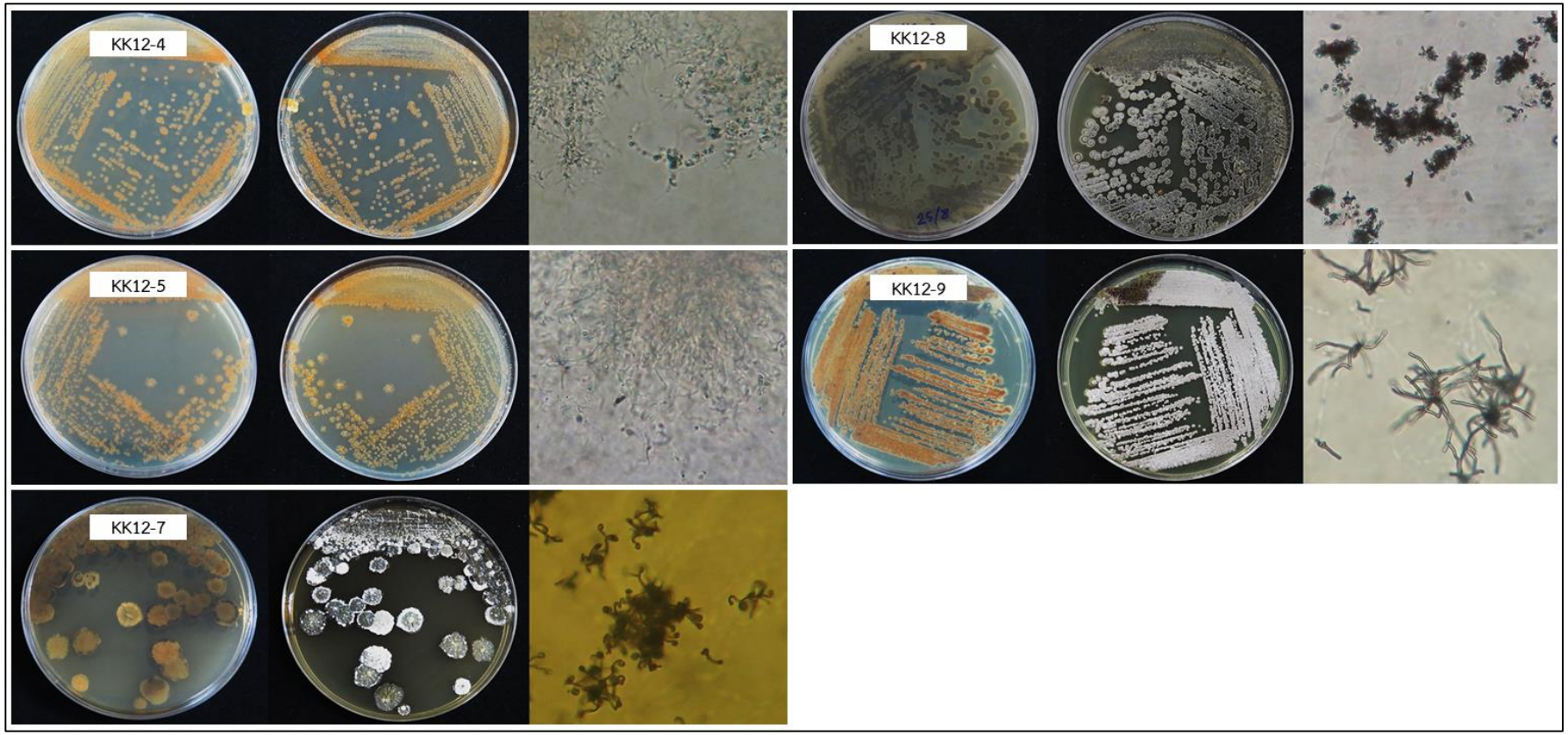
ภาพที่ 3-15 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK011 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-15 (ต่อ)

ตารางที่ 3-14 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK12 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

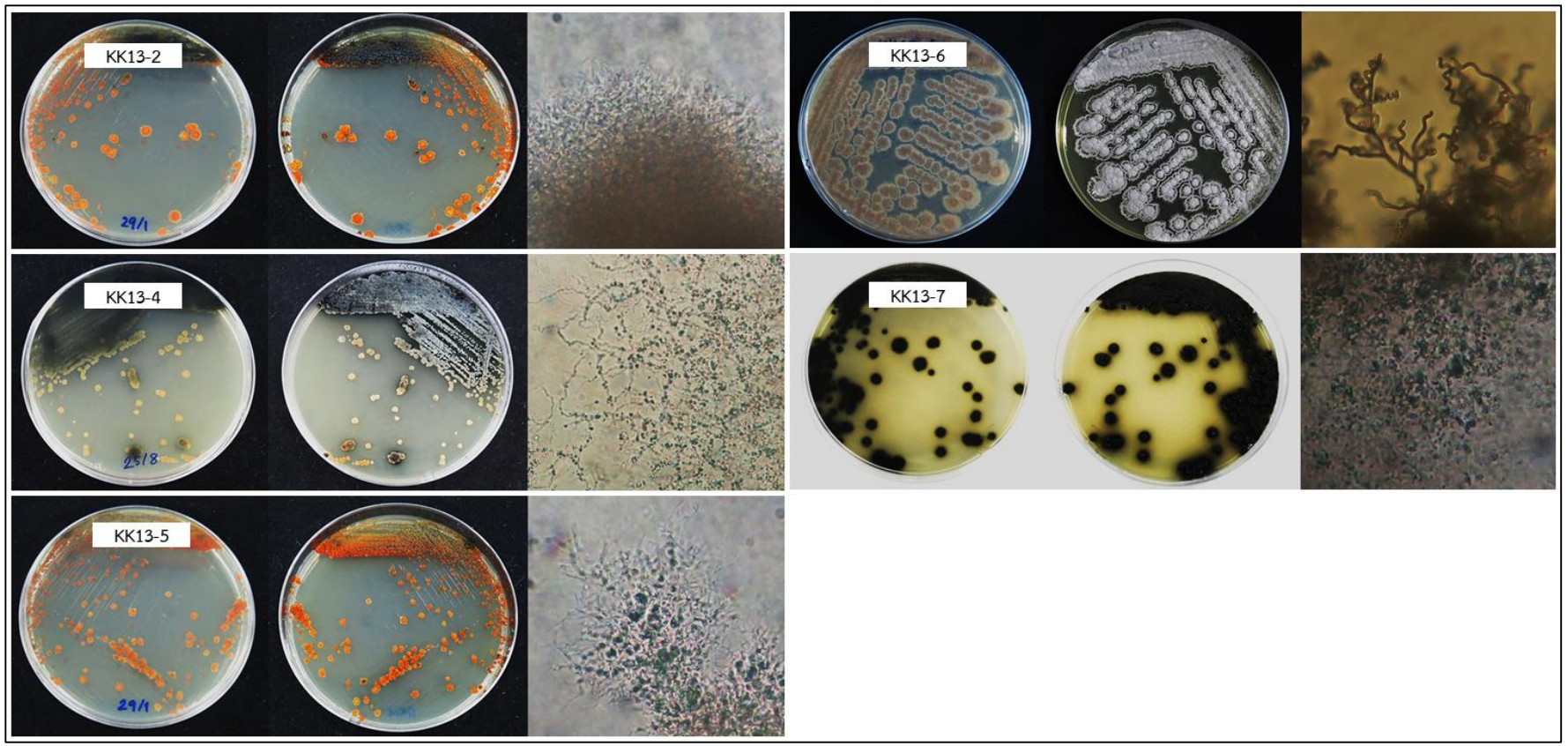
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK12-4	None	Brilliant orange	Brilliant orange	None	*Micromonspora*
KK12-5	None	Deep orange yellow	Vivid orange yellow	None	*Micromonspora*
KK12-7	Abundant, spiral	Grayish olive	Moderate olive	None	*Streptomyces*
KK12-8	Abundant, spiral	Grayish olive	Grayish olive	Grayish greenish yellow	*Streptomyces*
KK12-9	Abundant, straight	Light gray	Deep yellow	None	*Streptomyces*



ภาพที่ 3-16 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK012 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-15 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

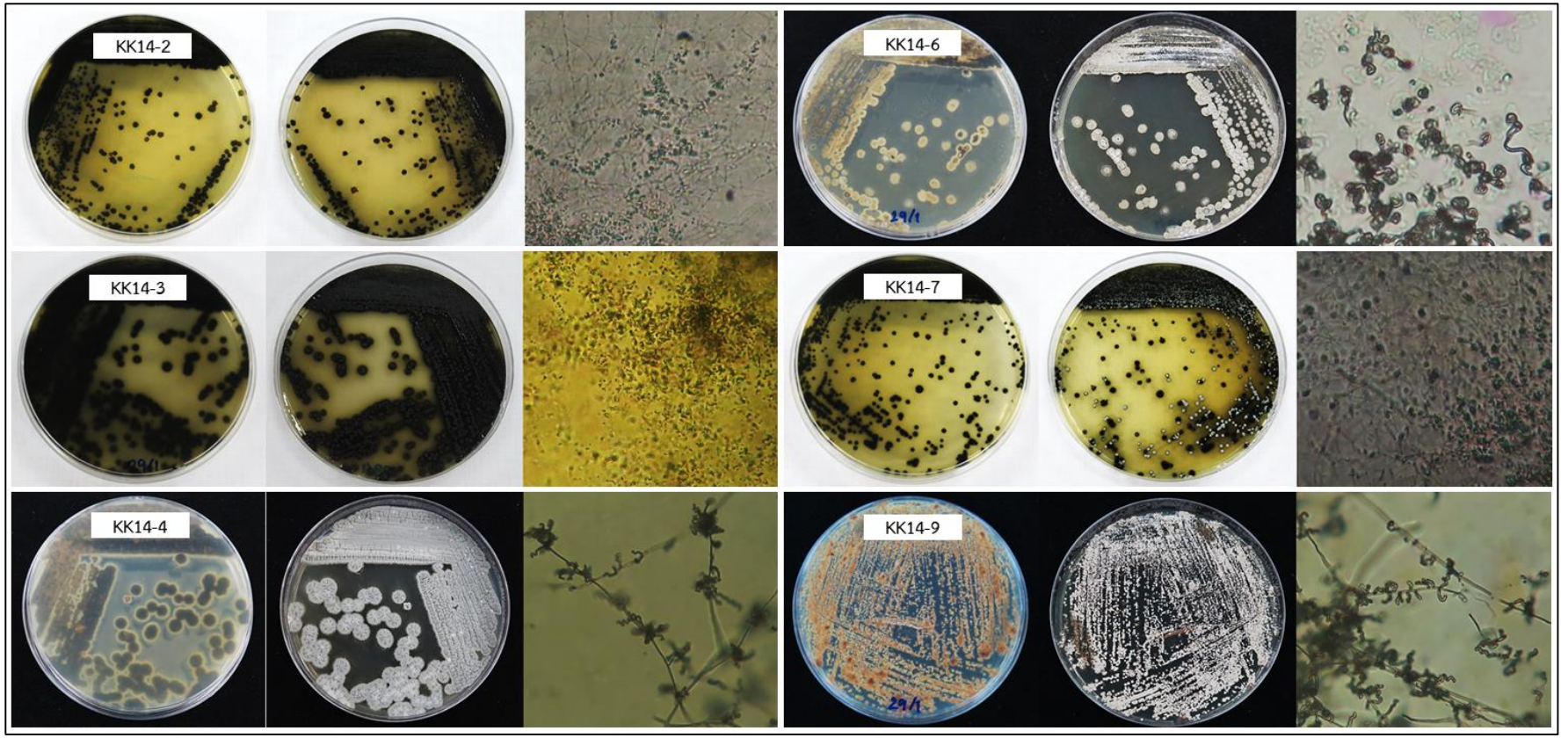
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK13-2	None	Vivid orange & black	Vivid orange & olive black	None	*Micromonospora*
KK13-4	None	Grayish yellow	Pale yellow & black	None	*Micromonospora*
KK13-5	None	Vivid orange - strong brown	Vivid orange-strong brown	None	*Micromonospora*
KK13-6	Abundant, open loop	Moderate olive brown-medium gray	Moderate olive brown	Dark yellow	*Streptomyces*
KK013-7	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*



ภาพที่ 3-17 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK013 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ตารางที่ 3-16 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK14 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK14-2	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK14-3	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK14-4	Abundant, spiral	Light gray-bluish gray	Dark yellow-moderate olive brown	None	*Streptomyces*
KK14-6	Abundant, open loop	Light grayish olive-grayish olive	Grayish olive	None	*Streptomyces*
KK14-7	None	Dark grayish olive-light bluish gray	Olive black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK14-9	Abundant, hook	Pale yellowish pink	Moderate orange yellow	None	*Nonomuraea*

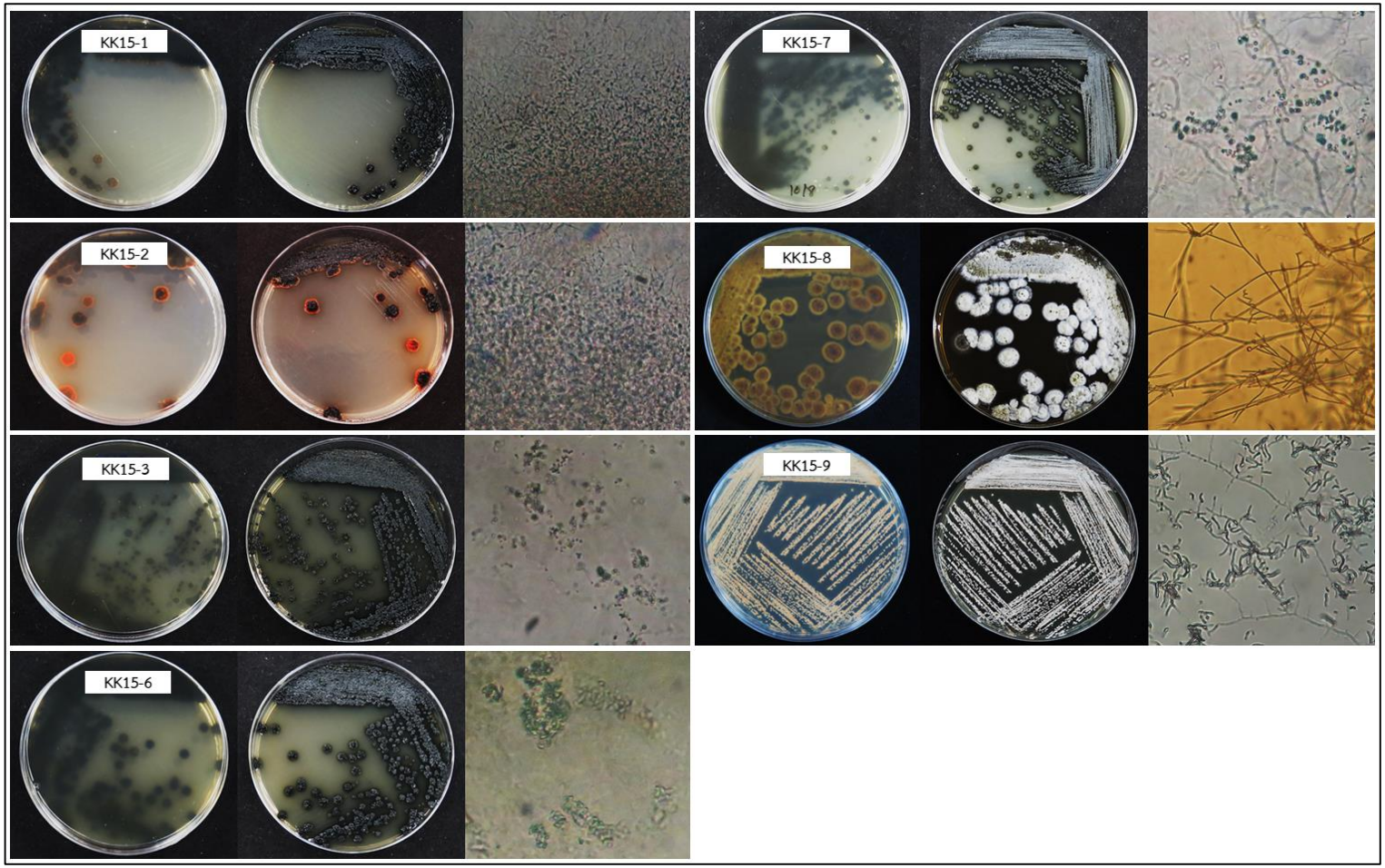


ภาพที่ 3-18 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK014

ตารางที่ 3-17 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK15 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 agar

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ	การจัดจำแนกในระดับสกุล
KK15-1	None	Black	Brownish black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK15-2	None	Vivid orange & black	Vivid orange & black	None	*Micromonospora*
KK15-3	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK15-6	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK15-7	None	Black	Black	Light grayish olive	*Micromonospora*
KK15-8	Abundant, straight	Greenish white-light greenish gray	Moderate greenish yellow-moderate olive brown	Deep yellow	*Streptomyces*
KK15-9	Moderate, short	Pinkish white-pale yellowish pink	Light orange yellow	None	*Nocardia*

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 3-19 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน KK015 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ร่วมกับการวิเคราะห์ความพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 70 ไอโซเลท พบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 3-19 และภาพที่ 3-20 ถึงภาพที่ 3-21) ซึ่งประกอบด้วย แอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Noccardia*, *Nonomuraea* และ *Streptomyces* ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

กลุ่มที่ 1 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Actinomadura* มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท KK09-1 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Actinomadura geliboluensis* A8036^{T} (100%)

กลุ่มที่ 2 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Micromonospora* มีจำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย ไอโซเลท KK04-13 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Micromonospora chaiyaphumensis* DSM 45246^{T} (99.6%) ไอโซเลท KK12-4, KK12-5, KK13-2, KK13-5, KK13-7, KK14-2 และ KK15-1 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Micromonospora chersina* DSM 44151^{T} (99.4-99.8%)

กลุ่มที่ 3 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Nocardia* มีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท KK11-9 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Nocardia araoensis* NBRC 100135^{T} (99.6%) และ KK15-9 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Nocardia xishanensis* NBRC 101358^{T} (100%)

กลุ่มที่ 4 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Nonomuraea* มีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท KK14-9 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Nonomuraea bangladeshensis* 5-10-10^{T} (99.8%) และ KK03-27 ซึ่งมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายคลึงกับ *Nonomuraea coxensis DSM* 45129^{T} (99.8%)

กลุ่มที่ 5 เป็นแอคติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* มีจำนวน 57 ไอโซเลท และจากผลการวิเคราะห์ความเหมือนของยีน 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียในสกุลนี้พบว่า เป็นกลุ่มที่พบความหลากหลายชีวภาพในระดับสปีชีส์มากที่สุด ซึ่งมีความหลากหลายของสปีชีส์ที่พบมากถึง 26 สปีชีส์ โดยมีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA gene คล้ายกับสมาชิกในสกุล *Streptomyces* อยู่ในช่วง 98.4-100% ดังแสดงในตารางที่ 3-19

ตารางที่ 3-18 ความเหมือนของลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA gene เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strains) ในฐานข้อมูล EZBioCloud

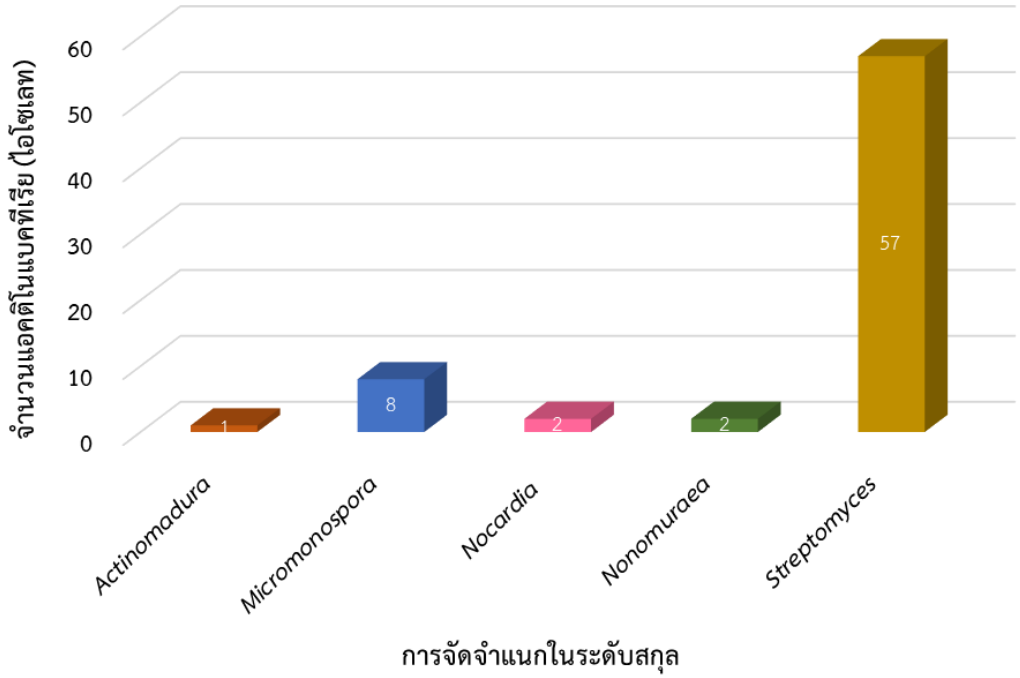
กลุ่มที่	ไอโซเลท	แอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strain)	% ความเหมือน
1	KK09-1	*Actinomadura geliboluensis* A8036^{T}	100
2	KK14-3	*Micromonospora chaiyaphumensis* DSM 45246^{T}	99.6
	KK12-4	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	98.8
	KK12-5	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	98.8
	KK13-2	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	99.6
	KK13-5	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	99.6
	KK13-7	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	99.6
	KK14-2	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	99.4
	KK15-1	*Micromonospora chersina* DSM 44151^{T}	99.6
3	KK11-9	*Nocardia araoensis* NBRC 100135^{T}	99.6
	KK15-9	*Nocardia xishanensis* NBRC 101358^{T}	100
4	KK14-9	*Nonomuraea bangladeshensis* 5-10-10^{T}	99.8
	KK03-27	*Nonomuraea coxensis DSM* 45129^{T}	99.8
5	KK10-10	*Streptomyces angustmyceticus* NRRL B-2347^{T}	99.7
	KK03-17	*Streptomyces aurantiogriseus* NBRC 1284^{2T}	98.4
	KK04-11	*Streptomyces canus* DSM 40017^{T}	99.2
	KK05-8	*Streptomyces chartreusis* NBRC 12753^{T}	99.4
	KK05-17	*Streptomyces coeruleofuscus* NBRC 12757^{T}	99.3
	KK05-18	*Streptomyces coeruleofuscus* NBRC 12757^{T}	98.8
	KK06-22	*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^{T}	99.5
	KK06-29	*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^{T}	99.6
	KK06-31	*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^{T}	99.6
	KK09-5	*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^{T}	99.6
	KK09-8	*Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^{T}	99.6
	KK06-4	*Streptomyces drozdowiczii* CBMAI 0498^{T}	99.6
	KK03-33	*Streptomyces gancidicus* NBRC 15412^{T}	99.8
	KK06-9	*Streptomyces globisporus* NBRC 12867^{T}	99.9
	KK05-15	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^{T}	100
	KK05-19	*Streptomyces globosus* LMG 19896^{T}	100
	KK08-6	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^{T}	100
	KK08-23	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^{T}	100

ตารางที่ 3-18 (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลท	แอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strain)	% ความเหมือน
5	KK09-3	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^T	99.4
	KK09-10	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^T	100
	KK09-12	Streptomyces hyderabadensis OU-40^T	99.8
	KK10-15	*Streptomyces hyderabadensis* OU-40^T	100
	KK11-13	*Streptomyces kunmingensis* NBRC 14463^T	99.4
	KK03-31	*Streptomyces lannensis* TA4-8^T	100
	KK06-7	*Streptomyces lannensis* TA4-8^T	100
	KK14-6	*Streptomyces lannensis* TA4-8^T	99.8
	KK05-3	*Streptomyces longispororuber* NBRC 13488^T	99.3
	KK05-13	*Streptomyces longispororuber* NBRC 13488^T	99.4
	KK05-12	*Streptomyces luteogriseus* NBRC 13402^T	99.4
	KK05-4	*Streptomyces matensis* NBRC 12889^T	99.8
	KK04-5	*Streptomyces omiyaensis* NBRC 13449^T	98.9
	KK08-10	*Streptomyces omiyaensis* NBRC 13449^T	98.9
	KK02-7	*Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T	99.7
	KK02-13	*Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T	100
	KK05-23	*Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T	100
	KK06-23	*Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T	100
	KK01-16	*Streptomyces pratensis* ch24^T	98.6
	KK13-6	*Streptomyces pseudogriseolus* NRRL B-3288^T	99.9
	KK06-13	*Streptomyces puniceus* NBRC 12811^T	99.9
	KK11-12	*Streptomyces puniceus* NBRC 12811^T	99.9
	KK08-22	*Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491^T	99.0
	KK08-22	*Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491^T	99.0
	KK02-6	*Streptomyces roche*i NRRL B-2410^T	100
	KK01-8	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	99.3
	KK01-11	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	100
	KK02-4	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	99.8
	KK03-30	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	99.9
	KK06-11	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	100
	KK06-24	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	99.4
	KK08-1	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^T	99.9

ตารางที่ 3-18 (ต่อ)

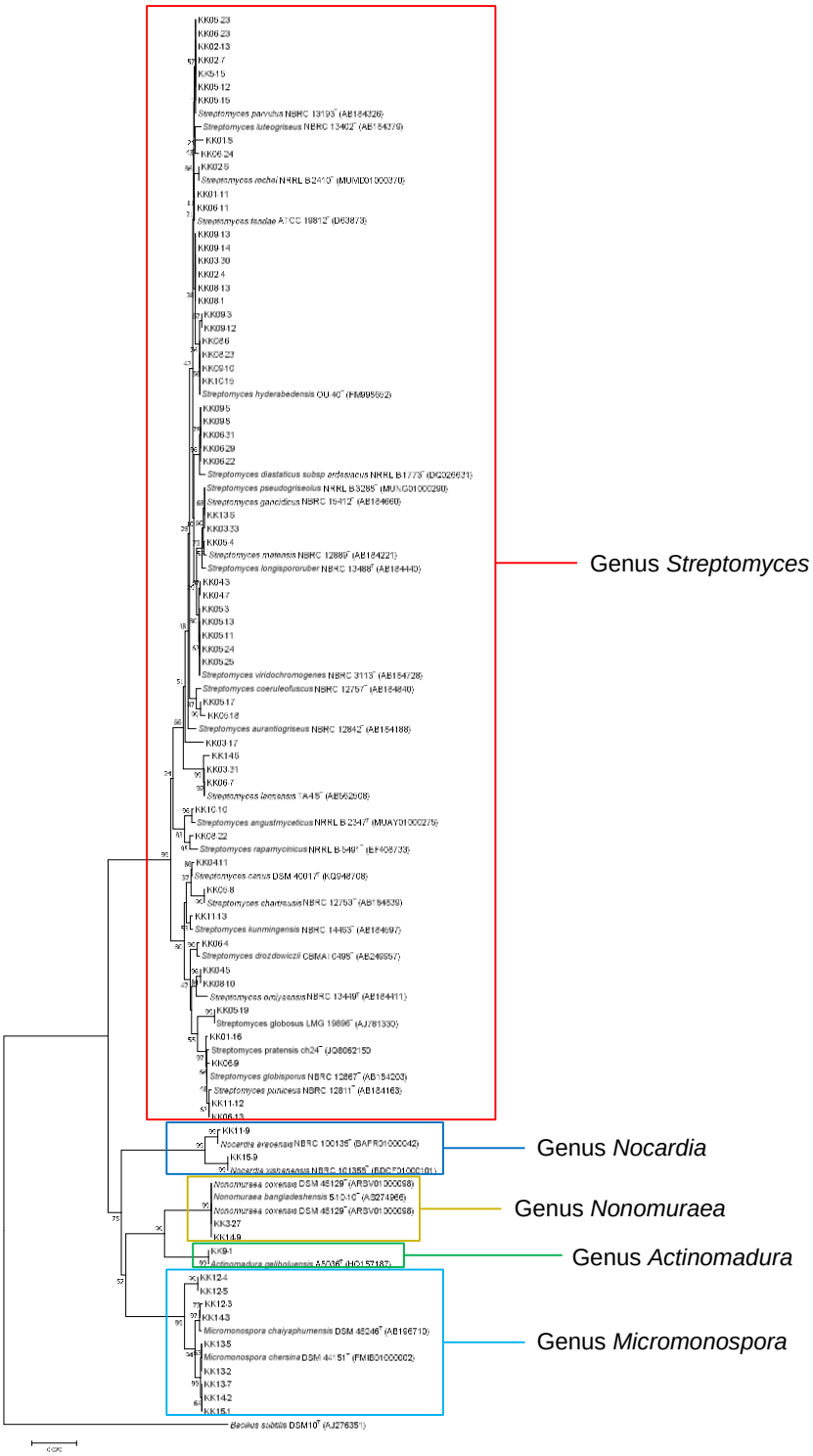
กลุ่มที่	ไอโซเลท	แอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strain)	% ความเหมือน
5	KK08-13	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^{T}	99.9
	KK09-13	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^{T}	99.9
	KK09-14	*Streptomyces tendae* ATCC 19812^{T}	99.9
	KK04-3	*Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^{T}	99.7
	KK04-7	*Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^{T}	99.8
	KK05-11	*Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^{T}	99.5
	KK05-24	*Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^{T}	100
	KK05-25	*Streptomyces viridochromogenes* NBRC 3113^{T}	100



ภาพที่ 3-20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแอคติโนแบคทีเรียกับการจัดจำแนกในระดับสกุลของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) ในฐานข้อมูล EZBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/)

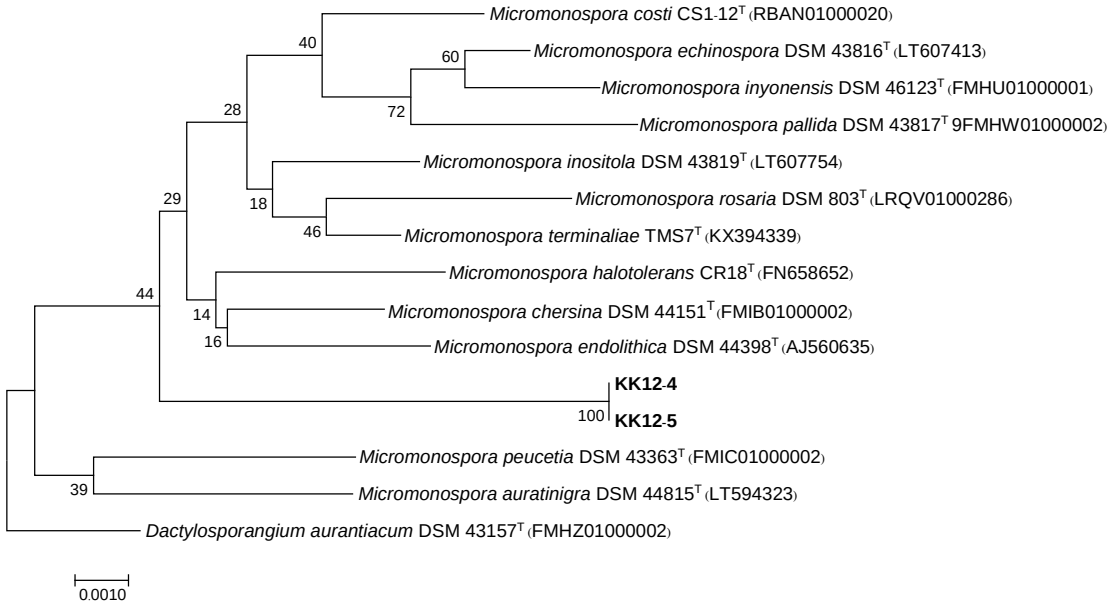
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 70 ไอโซเลท และแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strains) โดยการสร้าง phylogenetic gene ของยีนบริเวณ 16S rRNA พบว่า มี node ของ phylogenetic tree แยกกันอย่างชัดเจน จำนวน 5 nodes แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกสามารถจำแนกได้เป็น 5 สกุล ซึ่งประกอบด้วย *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea* และ *Streptomyces* (ภาพที่ 3-21)

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือก 70 ไอโซเลท จาก จำนวนทั้งหมด 132 ไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีน 16S rRNA พบว่า มีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท ที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ใน 2 สกุล คือ *Micromonospora* ได้แก่ ไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 และ *Streptomyces* ได้แก่ ไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 และ KK08-10 เนื่องจากมีความเหมือนของยีน 16S rRNA เทียบกับสปีชีส์อ้างอิงที่มีความใกล้เคียงกันที่สุดน้อยกว่า 99% ซึ่งเป็นไปตามผลการวิจัยของ Stackebrandt และ Eber ในปี 2006 ที่กล่าวไว้ว่า การนำจีโนมของแบคทีเรียมาเข้าคู่กับจีโนมของแบคทีเรียอ้างอิง (DNA-DNA hybridization) ที่มีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA น้อยกว่า 99% จะมีความเข้ากันได้ของจีโนมต่ำกว่า 70% และการที่จีโนมของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เข้าคู่กันได้น้อย 70% นั้น แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือสปีชีส์ใหม่ (Wayne et al., 1987)



ภาพที่ 3-21 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 70 ไอโซเลท กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (type strains)

แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *Micromonospora chersina* DSM 44151^{T} (98.8%) เมื่อนำยีนดังกล่าวของแอคติโนแบคทีเรีย ทั้งสองไอโซเลทมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Micromonospora* พบว่า ไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกจากสายพันธุ์ *Micromonospora chersina* DSM 44151^{T} และสายพันธุ์อื่น ๆ (ภาพที่ 3-22) ในสกุล *Micromonospora* ในขณะเดียวกันไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 มีวิวัฒนาการที่เหมือนกัน และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 (ภาพที่ 3-23 และ 3-24) พบว่า มีลักษณะและสีของโคโลนีที่เหมือนกันมาก ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 น่าจะเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora*



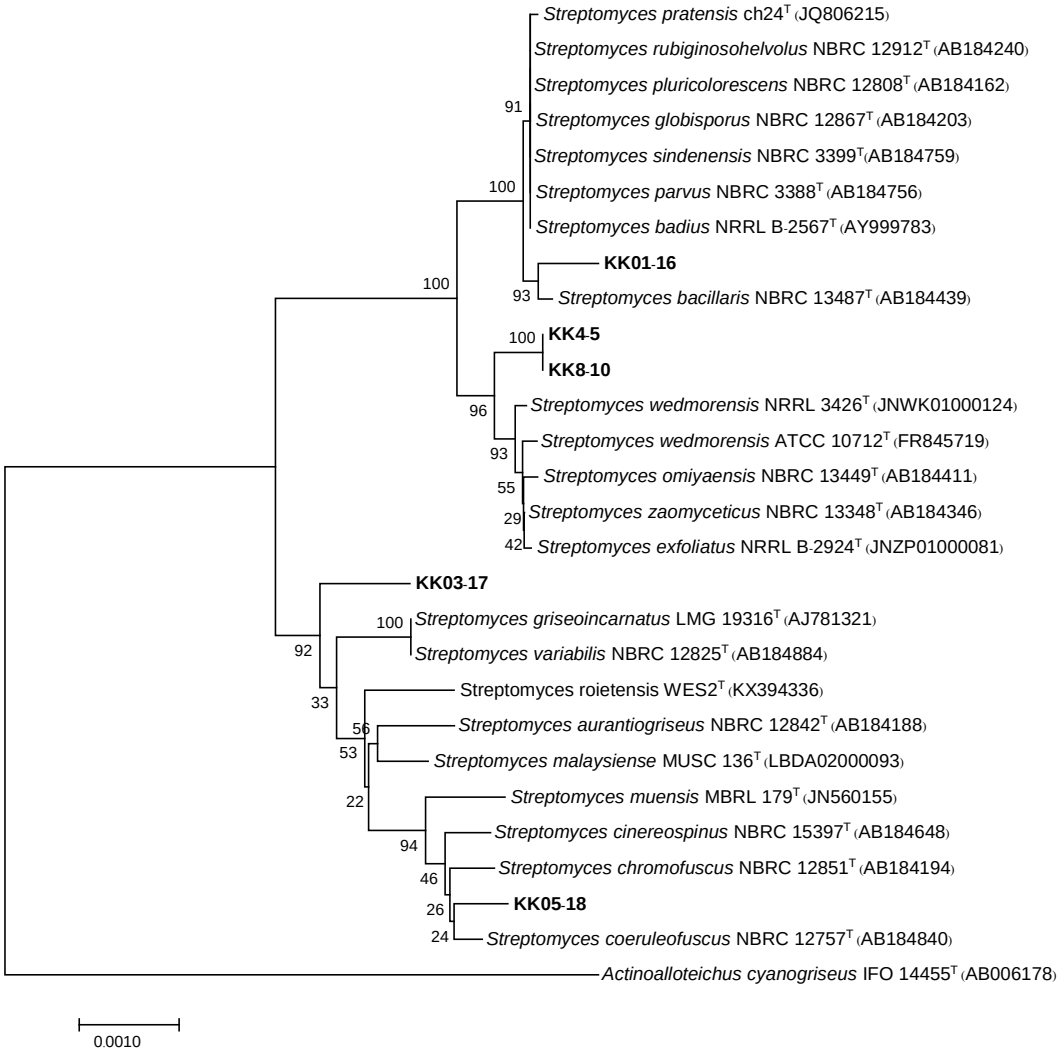
ภาพที่ 3-22 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Micromonospora*

ภาพที่ 3-23 ลักษณะโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยอาหารของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK12-4

ภาพที่ 3-24 ลักษณะโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยอาหารของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK12-5

แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท ไอโซเลท KK01-16 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *Streptomyces pratensis* ch24^{T} (98.6%) ไอโซเลท KK03-17 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *S. aurantiogriseus* NBRC 1284^{2T} (98.4%) ไอโซเลท KK04-5 และ KK08-10 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *S. omiyaensis* NBRC 13449^{T} (98.9%), KK03-17 และไอโซเลท KK05-18 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *S. coeruleofuscus* NBRC 12757^{T} (98.8%) เมื่อนำยีน 16S rRNA ของไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 และ KK08-10 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree เทียบกับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Streptomyces* (ภาพที่ 3-25) พบว่า ไอโซเลท KK01-16 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. bacillaris* NBRC 13487^{T} ซึ่งมีความเหมือนของยีน 16S rRNA เท่ากับ 98.1% ไอโซเลท KK03-17 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกจากสายพันธุ์ *S. aurantiogriseus* NBRC 1284^{2T} และสายพันธุ์อื่น ๆ ในสกุล *Streptomyces* ไอโซเลท KK04-5 และ KK08-10 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. wedmorensis* NRRL 3426^{T} ซึ่งมีความเหมือนของยีน 16S rRNA เท่ากับ 98.8% และในขณะเดียวกันไอโซเลท KK04-5 และ KK08-10 มีวิวัฒนาการที่เหมือนกัน และเมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 (ภาพที่ 3-26 และ 3-27) พบว่า มีลักษณะของโคโลนี และเส้นใยอากาศที่เหมือนกันมาก ซึ่งคาดว่า

น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และไอโซเลท KK05-18 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *S. coeruleofuscus* NBRC 12757^{T} ซึ่งมีความเหมือนของยีน 16S rRNA เท่ากับ 98.8% ดังนั้น จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สามารถสรุปได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 และ KK08-10 น่าจะเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces*



ภาพที่ 3-25 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK05-18, KK04-5 และ KK08-10 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Streptomyces*

ภาพที่ 3-26 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK04-5

ภาพที่ 3-27 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท KK08-10

3.3 การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น

การนำแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 132 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 เพื่อให้ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ และนำเมแทบอไลต์ทุติยภูมิปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพกับเชื้อทดสอบ ซึ่งประกอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า แอคติโนแบคทีเรียจำนวน 46 ไอโซเลท มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบ (ดังตารางที่ 3-20) เมื่อแบ่งแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิตามการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ สามารถแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม (ภาพที่ 3-28) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แอคติโนแบคทีเรียที่ที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีจำนวน 86 ไอโซเลท (65.2%)

กลุ่มที่ 2 แอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเฉพาะ *M. luteus* ATCC 9341 มีจำนวน 6 ไอโซเลท (4.5%) ได้แก่ KK01-16, KK03-30, KK08-6, KK08-23, KK10-15 และ KK11-11 โดยไอโซเลท KK01-16 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *M. luteus* ATCC 9341

กลุ่มที่ 3 แอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเฉพาะเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 จำนวน 1 ไอโซเลท (0.8%) คือ KK06-4

กลุ่มที่ 4 แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *M. luteus* ATCC 9341 มีจำนวน 7 ไอโซเลท (5.3%) ได้แก่ KK04-2, KK04-5, KK06-29, KK08-13, KK09-9, KK09-12 และ KK09-13 โดยไอโซเลท KK06-9 และ KK08-13 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *M. luteus* ATCC 9341

กลุ่มที่ 5 แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 มีจำนวน 2 ไอโซเลท (1.5%) ได้แก่ KK05-11 และ KK05-19 โดยไอโซเลท KK05-19 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923

กลุ่มที่ 6 แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้าน *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 มีจำนวน 4 ไอโซเลท (3.0%) ได้แก่ KK03-33, KK03-38, KK09-1 และ KK13-6 โดยไอโซเลท KK03-38 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923

กลุ่มที่ 7 แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งประกอบด้วย *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 มีจำนวน 24 ไอโซเลท (18.2%) ได้แก่ KK01-8, KK02-2, KK02-7, KK02-13, KK04-10, KK05-8, KK05-13, KK05-23, KK05-24, KK05-25, KK06-13, KK06-23, KK07-2, KK07-12, KK07-21, KK08-1, KK08-17, KK08-22, KK09-14, KK09-19, KK10-10, KK11-1, KK11-4 และ KK11-13 โดยไอโซเลท KK02-7 และ KK02-13 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923

กลุ่มที่ 8 แอคติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งประกอบด้วย *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 มีจำนวน 2 ไอโซเลท (1.5%) คือ KK06-20 และ KK11-2 โดยไอโซเลท KK06-20 ซึ่งเป็นแอคติโนแบคทีเรียเรียในสกุล *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231

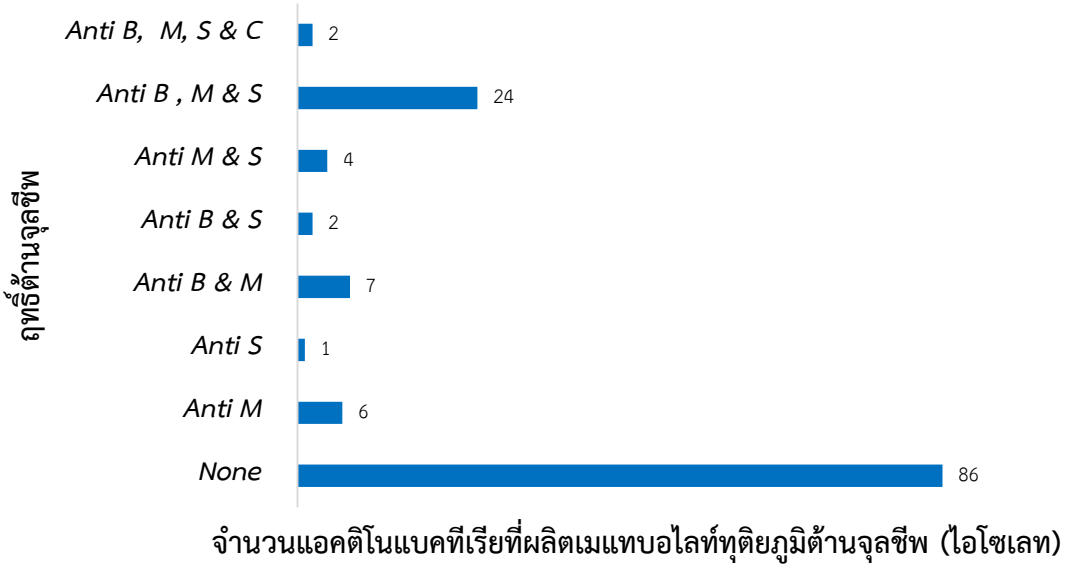
จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 132 ไอโซเลท พบว่าแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* ไอโซเลท KK06-20 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ตารางที่ 3-19 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (ND; ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทดสอบ)

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	B. subtilis ATCC 6633	*M. luteus* ATCC 9341	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*C. albicans* ATCC 10231
KK01-8	14.3±0.58	25.3±0.58	19.0±0.00	ND	ND	ND
KK01-16	ND	33.3±0.58	ND	ND	ND	ND
KK02-2	20.7±0.58	31.0±0.00	25.0±0.00	ND	ND	ND
KK02-7	33.7±0.58	39.0±0.00	34.0±0.00	ND	ND	ND
KK02-13	33.3±0.58	41.7±0.58	34.3±0.58	ND	ND	ND
KK03-30	ND	14.0±0.00	ND	ND	ND	ND
KK03-33	ND	24.3±1.15	13.6±0.58	ND	ND	ND
KK03-38	ND	32.3±2.08	20.0±0.00	ND	ND	ND
KK04-2	11.3±0.58	11.7±0.58	ND	ND	ND	ND
KK04-5	12.3±0.58	15.0±0.00	ND	ND	ND	ND
KK04-10	15.3±0.58	27.7±0.58	15.0±0.01	ND	ND	ND
KK05-8	16.7±0.58	20.7±0.58	18.0±0.00	ND	ND	ND
KK05-11	12.0±0.00	ND	12.2±0.30	ND	ND	ND
KK05-13	12.7±0.58	13.0±0.00	12.0±0.00	ND	ND	ND
KK05-19	13.7±0.58	ND	17.0±1.0	ND	ND	ND
KK05-23	30.0±0.00	36.3±0.58	32.3±0.58	ND	ND	ND
KK05-24	17.3±0.58	21.3±0.58	21.3±0.58	ND	ND	ND
KK05-25	12.0±0.00	11.0±0.00	12.3±0.58	ND	ND	ND
KK06-4	ND	ND	19.0±0.00	ND	ND	ND
KK06-13	17.3±0.58	22.0±1.00	20.3±0.58	ND	ND	ND
KK06-20	32.0±0.00	42.3±0.58	40.3±0.58	ND	ND	32.0±1.00
KK06-23	25.0±0.00	28.0±0.00	24.7±0.58	ND	ND	ND
KK06-29	12.0±0.00	21.0±0.00	ND	ND	ND	ND
KK07-2	15.3±0.58	17.0±1.00	17.7±0.58	ND	ND	ND
KK07-12	16.0±0.00	17.3±0.58	18.0±0.00	ND	ND	ND

ตารางที่ 3-19 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	B. subtilis ATCC 6633	*M. luteus* ATCC 9341	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*C. albicans* ATCC 10231
KK07-21	16.0±0.00	18.7±0.58	19.0±0.00	ND	ND	ND
KK08-1	17.3±0.58	24.0±1.00	11.3±0.58	ND	ND	ND
KK08-6	ND	19.7±0.58	ND	ND	ND	ND
KK08-13	13.0±0.00	20.7±0.58	ND	ND	ND	ND
KK08-17	18.0±0.00	17.3±0.58	18.0±0.00	ND	ND	ND
KK08-22	22.7±0.58	28.3±0.58	20.3±0.58	ND	ND	ND
KK08-23	ND	18.0±0.00	ND	ND	ND	ND
KK09-1	ND	26.7±0.58	22.7±0.58	ND	ND	ND
KK09-9	11.3±0.58	11.2±0.29	ND	ND	ND	ND
KK09-12	11.0±0.00	18.3±0.58	ND	ND	ND	ND
KK09-13	12.3±0.58	11.3±0.58	ND	ND	ND	ND
KK09-14	19.0±0.00	21.3±0.58	12.0±0.00	ND	ND	ND
KK09-19	11.0±0.00	28.3±1.15	23.3±0.58	ND	ND	ND
KK10-10	20.0±0.00	21.2±0.29	22.7±0.58	ND	ND	ND
KK10-15	ND	15.0±0.00	ND	ND	ND	ND
KK11-1	12.0±0.00	23.3±0.58	22.0±0.00	ND	ND	ND
KK11-4	16.0±0.00	19.0±0.00	18.3±0.58	ND	ND	ND
KK11-11	ND	21.7±0.58	ND	ND	ND	ND
KK11-12	21.7±0.58	23.3±0.58	22.0±1.00	ND	ND	18.0±0.00
KK11-13	18.7±0.58	20.3±0.58	13.0±0.00	ND	ND	ND
KK13-6	ND	25.3±0.58	14.3±0.58	ND	ND	ND



ภาพที่ 3-28 กราฟแสดงจำนวนแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบ

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาเขียว-เขาชมภู่ จำนวน 132 ไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางจีโนไทป์ ซึ่งประกอบด้วย การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สามารถสรุปได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้มี 5 สกุล คือ *Actinmadura* (1.5%), *Micromonospora* (11.4%), *Nocardia* (6.1%), *Nonomuraea* (4.5%) และ *Streptomyces* (76.5%) และพบว่ามีแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 7 ไอโซเลท ที่น่าจะเป็นแอคติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora* (ไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5) และสกุล *Streptomyces* (ไอโซเลท KK01-16, KK03-17, KK04-5, KK05-18 และ KK08-10)

การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น พบว่ามีแอคติโนแบคเรีย จำนวน 46 ไอโซเลท (34.8%) สามารถผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก หรือยีสต์ทดสอบ แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ โดย *Streptomyces* ไอโซเลท KK01-16 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเฉพาะ *M. luteus* ATCC 9341 ไอโซเลท KK06-4 เป็นเพียงสายพันธุ์เดียวที่ผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเฉพาะ *S. aureus* ATCC 25923 ไอโซเลท KK06-9 และ KK08-13 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *M. luteus* ATCC 9341 ไอโซเลท KK05-19 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 ไอโซเลท KK03-38 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ไอโซเลท KK02-7 และ KK02-13 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 และไอโซเลท KK06-20 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 25923 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 ดังนั้น ในการคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพเบื้องต้น สามารถสรุปได้ว่า *Streptomyces* ไอโซเลท KK06-20 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพ

บรรณานุกรม

Ando, K., Murakami, Y. & Nawata, Y. (1971). Tetranactin, a new miticidal antibiotic. II. Structure of tetranactin. *The Journal of Antibiotics*. 24: 418-422.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clement, C., Ouhdouch, Y., and Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 80: 2-43.

Berdy, J. (2005). Microbial bioactive secondary metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 58, 1-26.

British Crop Protection Council. (1994). The pesticide manual, 10th ed. British Crop Protection Council, Alton, United Kingdom.

Bunbamrung, N., Dramae, A., Srichomthong, K., Supothina, S. & Pittayakhajonwut, P. (2014). Streptophenazines I–L from *Streptomyces* sp. BCC21835. *Phytochemistry Letters*. 10: 91-94.

Campbell, W.C. (2012). History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 853-865.

Dramae, A., Nithithanasilp, S., Choowong, W., Rachtawee, P., Prabpai, S., Kongsaeree, P., & Pittayakhajonwut, P. (2013). Antimalarial 20-membered macrolides from *Streptomyces* sp. BCC33756. *Tetrahedron*. 69: 8205-8208.

Donald, P. L. (2006). Vancomycin: A history. *Clinical Infectious Diseases*. 42: S5-S12.

Dutcher, J. D. (1968). The discovery and development of amphotericin B. *Diseases of the Chest*. 54, 296-298.

Endo, A. & Misato, T. (1969). Polymyxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltranssferase in Neurospora cassa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 37: 718-722.

Eisenstein, B. I., Oleson, F. B. & Baltz, R. H. (2010). Daptomycin: from the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, M.D. *Clinical Infectious Diseases*. 50: S10-S15.

Espinel-Ingroff, A. (1996). History of medical mycology in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 9: 235-272.

Garrod, L. P. (1957). The erythromycin group of antibiotics. *British Medical Journal*. 2: 57-63.

Goodfellow, M. & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 37: 189-216.

Gao, B. & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signaturesfor the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76:66–112.

Goodfellow, M. & Minnikin D. E. (1985). Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London, United Kingdom.

Haraka, S. & Kishi, T. (1978). Isolation and characterization of mildiomycin, a new nucleoside antibiotic. *The Journal of Antibiotics*. 31: 519-524

Hollstein, U. (1974). Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chemical Reviews*. 74: 625-652.

Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y. & Suzuki, S. (1965). Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agricultural and Biological Chemistry* (Tokyo). 29: 848-854.

Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008). *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 924–928

Kameda, Y. (1987). Validoxylamines as trehalase inhibitors. *The Journal of Antibiotics*. 40: 563-565.

Kim, T. K., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N. & Fuerst, J. A. (2005). Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 2118-2125.

Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiology Letters*. 319:1-10.

Klykleung, N., Phongsopitanun, W., Pittayakhajonwut, P., Ohkuma, M., Kudo, T. & Tanasupawat, S. (2016). *Streptomyces phyllanthi* sp. nov., isolated from the

stem of *Phyllanthus amarus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 3923-3928.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.

Labeda, D. (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology*. 28:115-121.

Lomovskaya, N., Otten, S. L., Doi-Katayama, Y., Fonstein L., Liu, X.C., Takatsu, T., Inventi-Solani, A., Filippini, S., Torti, F., Colombo, A. L. & Hutchinson, C.R. (1999). Doxorubicin Overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the dnrU keroreductase and dnrV genes and the doxA cytochrome P-450 hydroxylase gene. *Journal of Bacteriology*. 181: 305-318.

Manallack, D.T., Crosby, I.T., Khakham, Y. & Capuano, B. (2008). Platensimycin: a promising antimicrobial targeting fatty acid synthesis. *Current Medicinal Chemistry*. 15: 705-710.

Mayfield, C. I, Williams, S. T., Ruddick, S. M. & Hatfield H. L. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 4: 79-91.

Misato, T. (1982). Present status and future prospects of agricultural antibiotics. *Journal of Pesticide Science*. 7: 301-305.

Mukhtar, T.A. & Wright, G.D. (2005). Streptogramins, Oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. *Chemical Reviews*. 105: 592-542.

Nakaew, N., Sungthong, R., Yokota, A. & Lumyong, S. (2012.) *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 3007-12.

Nelson, M. L. & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1241: 17-32.

Oishi, H., Sugawa, T., Okutomi, T., Suzuki, K. & Hayashi, T. (1970). Insecticidal activity of macrotetrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics*. 23: 105-106.

Phongsopitanun, W., Kudo, T., Mori, M., Shiomi, K., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K. & Tanawupawat, S. (2015). *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 65: 4417-4423.

Phongsopitanun, W., Kudo, T., Ohkuma, M., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K. & Tanasupawat, S. (2016). *Micromonospora sediminis* sp. nov., isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, 3235–3240.

Phongsopitanun, W., Kudo, T., Ohkuma, M., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K. & Tanasupawat, S. (2016). *Streptomyces verrucosisporus* sp. nov., isolated from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.001240 (Article in Press).

Phongsopitanun, W., Kudo, T., Ohkuma, M., Suwanborirux, K. & Tanasupawat, S., (2015). *Dactylosporangium sucinum* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. *The Journal of Antibiotics*. 68: 379-384.

Phongsopitanun, W., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Kudo, T., Mori, M., Shiomi, K., Takahashi, Y. & Tanasupawat, S. (2016). *Actinoplanes lichenis* sp. nov., isolated from lichen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 468-473.

Phongsopitanun, W., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2015). *Actinomadura rayongensis* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 65: 890-895.

Phongsopitanun, W., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., Ohkuma, M. & Tanasuwawat, S. (2014). *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 64: 2605-2610.

Sery, T. W., Paul, S.D., Leopold, I. H. & Ronca, M. (1957). Novobiocin, a new antibiotic ocular penetration and tolerance, *A.M.A. archives of ophthalmology*. 57: 100-109.

Singh, B. & Mitchison, D. A. (1954). Bactericidal activity of streptomycin and isoniazid against tubercle bacilli. *British Medical Journal*. 1: 130-132.

Songsumanus, A., Kudo, T., Ohkuma, M., Phongsopitanun, W., & Tanasupawat, S. (2016). *Actinomadura montaniterra* sp. nov., isolated from mountain soil in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/ijsem.0.001196 (Article in Press)

Sripreechasak, P., Matsumoto, A., Suwanborirux, K., Inahashi, Y., Shiomi., K. Tanasupawat, S. and Takahashi, Y. (2013). *Streptomyces siamensis* sp. nov., and *Streptomyces similanensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *The Journal of Antibiotics*. 66: 633-640.

Sripreechasak, P., Tamura, T., Shibata, C., Suwanborirux, K. & Tanasupawat. (2016). *Streptomyces andamanensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66:2030-2034.

Sripreechasak, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Inahashi, Y., Matsumoto, A., Shiomi, K. and Takahashi, Y. (2013). *Nonomuraea thailandensis* sp. nov. isolated from Thai soil. *The Journal of Antibiotics*. 66: 79-84.

Stackebrandt, E. & Eber, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology*. 6: 152-155.

Supong, K., Suriyachadkun, C., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K. & Thawai, C. (2013). *Micromonospora spongicola* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 505-509.

Supong, K., Suriyachadkun. C., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P. & Thawai, C. (2013). *andamanensis* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International Journal of Verrucosispora Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 3970-3974.

Supong, K., Thawai, C., Suwanborirux, K., Choowong, W., Supothina, S. & Pittayakhajonwut, P. (2012). Antimalarial and antitubercular C-glycosylated benz[α]anthraquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. BCC45596 Phytochem Lett. 5: 651-656.

Tanasupawat, S., Phongsopitanun, P., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2016). *Nocardia rayongensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 1950-1955.

Tanasupawat, S., Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2016). *Streptomyces actinomycinicus* sp. nov., isolated from soil of a peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 290-295.

Thawai, C. (2015). *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 1456–1461.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T. (2005). *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 229-234

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. & Kudo T. (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 417-422.

Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M. & Takeuchi, T. (1965). A new antibiotic, kasugamycin. *The Journal of Antibiotics*. 18: 101-103.

Venugopal, A.A. & Johnson, S. (2011). Fidaxomicin: A novel macrocyclic antibiotic approved for threatment of *Clostridium difficile* infection. CID, 1-7.

Waksman, S. A. (1949). Neomycin-production and antibiotic properties. *Journal of Clinical Investigation*. 28: 934-939.

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. *International journal of systematic bacteriology*. 37: 463–464

Weinstein, M., Leudemann, G. M., Oden, E. M., Wagman, G. H., Rosselet, J. P., Marquez, J. A., Coniglio, C. T., Charney, W., Herzog, H. L. & Back, J. (1963). Gentamicin, A

new antimicrobial complex from Micromonospora. *Journal of Medicinal Chemistry*. 6: 463-464.

West, D.B., Cochran, J.B. & Tecklenburg, F.W. (2012). Chloramphenicol toxicity revisited: A 12- year- old patient with a brain abscess. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 17: 182-188.

Williams, S. T., Goodfellow, M. & Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL, p 2452–2492. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 1st ed, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD