รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดิน

Isolation and anti-microbial activity of actinomycetes from soils

โดย

ดร.จิตติ ท่าไว

RGH
QR
82
.A35
จ๗๑๑
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 84059
วัน,เดือน,ปี 25 ก.ย. 2551

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนจากโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

b. 11989480
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อ การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดิน

ผู้วิจัย ดร.จิตติ ท่าไว

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปี พ.ศ. 2550

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้จำนวน 55 ไอโซเลต จากดินจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 6 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 1 สร้างเส้นใยอากาศสีเทา สปอร์มีลักษณะกลมต่อเป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 2 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา สปอร์มีลักษณะกลมต่อเป็นสายโซ่ยาวตรง เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 3 ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะกลมเดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารสีส้ม เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 4 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวเทา พบการสร้างสปอร์แรงเจียมเกิดอยู่บนก้านชูสปอร์แรงเจียมที่แตกกิ่งจากเส้นใยอากาศ เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 5 สร้างเส้นใยอากาศสีขาว สปอร์มีลักษณะกลมต่อเป็นสายโซ่สั้น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 6 สร้างเส้นใยอากาศสีชมพู สปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น

น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตตและเอ็น-บิวทานอล ตัวเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ถูกนำมาหมักด้วยเมทานอล สารสกัดหยาบเหล่านี้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ผลที่ได้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ร้อยละ 83.6 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากข้อมูลที่ได้ศึกษามาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ดินบริเวณจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรีจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่ดีแหล่งหนึ่งสำหรับการศึกษาเพื่อหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีทส์ การแยกเชื้อ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Isolation and anti-microbial activity of actinomycetes from soils

Researcher Dr.Chitti Thawai

Program Biotechnology

Department Applied Biology

Year 2007

ABSTRACT

In the course of our investigation for the antibiotic-producing actinomycetes. Fifty-five actinomycetes isolates were isolated from soils in Ratchaburi and Kanchanaburi provinces. These isolates could be grouped by using morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into six groups. The actinomycetes group I produced the grey aerial mycelia that usually bear long chains of spores in spiral type. Group II produced the grayish white aerial mycelia and straight chain of spores. Group III could not produce the aerial mycelia. This group produced the single spore directly on orange substrate myclia. Group IV produced the grayish white aerial mycelia with globose sporangia borne at the tips of sporaniophores branched from the aerial hyphae. Group V produced the white aerial mycelia with short chain of spores. Group VI produced the pink aerial mycelia with longitudinal pairs of spores on short sporophores.

The fermentation broth of representative isolate in each group was extracted with three organic solvents, hexane, ethylacetate and n-butanol. The cells of actinomycetes were macerated with methanol. These crude extracts were tested for anti-microbial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Candida albicans* ATCC 10231. The results revealed that 83.6% of actinomycetes using in this study inhibited the growth of test microorganisms. Based on these study, we conclude that the soil samples of Ratchaburi and Kanchanaburi provinces were an excellent source for antibiotic-producing actinomycetes investigation.

Keywords : Actinomycetes, Isolation, Anti-microbial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ดร.จิตติ ท่าไว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	9
3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ	9
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง	9
3.1.2 การแยกเชื้อ	9
3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์	9
3.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ	10
3.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี	10
3.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น	10
3.5 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	10
3.6 การสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ	11
3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	11
3.7.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	12
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ	12
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	13
4.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ	1
2	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	3
3	ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีสท์	6
4	สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces*	7
5	แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้แต่ละไอโซเลต	12
6	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	20
7	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	23
8	แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 1	13
2	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 2	14
3	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 3	15
4	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 4	16
5	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 5	17
6	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 6	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้นทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังที่ปรากฏในข่าวจากสื่อต่างๆ ของการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใหม่ ยังผลให้เกิดการเสียหายต่อชีวิต ทรัพย์สิน และเศรษฐกิจทางการเกษตรโดยรวม แนวทางแก้ปัญหาแนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อโรคดื้อยาเหล่านั้น จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญ (ตารางที่1) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย

ตารางที่1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ (Bérdy, 2005)

Source	Antibiotics	"Other bioactive" metabolites	Total bioactive metabolites	Practically used (in human therapy)	Inactive metabolites
Bacteria	2900	900	3800	10~12(8~10)	3000 to 5000
Actinomycetales	8700	1400	10100	100~120(70~75)	5000 to 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35(13~15)	2000 to 15000
Total	16500	6000	22500	140~160 (~100)	20000to 25000

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทส์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ10-50 คือเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอคติโนมัยซีทส์ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983) จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด (ตารางที่ 2) เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005)

จากข้อมูลจะเห็นว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์หายากสกุลอื่นๆนั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและการกระจายตัว (distribution) ของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์หายากสกุลอื่นๆ รวมทั้งสกุล *Streptomyces* จากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงเพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยเห็นว่าป่าไม้ในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทย เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งในประเทศไทยซึ่งยังมีการศึกษา และทำการวิจัยทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อต่างๆ เพียงเล็กน้อย

เนื่องจากป่าเต็งรังในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทย ยังคงความเป็นธรรมชาติที่สมบรูณ์ กอปรกับมีความหลากหลายของสัตว์ และพืชสูงมาก ดังนั้นแนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของจุลินทรีย์จึงน่าจะมีสูง และมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแหล่งอื่น

ด้วยลักษณะอันจำเพาะของของแหล่งธรรมชาติและความหลากหลายทางด้านชีวภาพอาจส่งผลให้การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์หายากสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนเพิ่มสูงขึ้น และเนื่องจากปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนมากได้พัฒนาตัวเองจนสามารถต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องดำเนินต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2. แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (Bérdy, 2005)

***Streptomycetaceae*:**	
Streptomyces	~8000
Streptoverticillium	258
Kitasatosporia	37
Chainia	30
Microellobosporia	11
Nocardioides	9
***Micromonosporaceae*:**	
(*Actinoplanetes*)	
Micromonospora	740
Actinoplanes	248
Dactylosporangium	58
***Micromonosporaceae*(ต่อ)**	
Ampullariella	9
Glycomyces	2
Catenuloplanes	3
Catellatospora	1
***Pseudonocardiaceae*:**	
Saccharopolyspora	131
Amycalotopsis/*Nocardia*	120/357
Kibdellosporangium	34
Pseudonocardia	27
Amycolata	12
Saccharomonospora	2
Actinopolyspora	1
***Streptosporangiaceae*:**	
(*Maduromycetes*)	
Streptosporangium	79
Streptoalloteichus	48
Spirillospora	11
Planobispora	10
Kutzneria	4
Planomonospora	2

***Thermomonosporaceae*:**	
Actinomadura	345
Saccharothrix	68
Microbispora	54
Actinosynnema	51
Nocardiopsis	41
Microtetrasporal/*Nonomuria*	26/21
Thermomonospora	19
Micropolysporal/*Faenia*	13/3
Thermoactinomyces	14
Thermopolyspora	1
Thermoactinopolyspora	1
***Mycobacteriaceae*:**	
(*Actinobacteria*)	
Nocardia	(357)
Mycobacterium	57
Arthrobacter	25
Brevibacterium	17
Proactinomyces	14
Rhodococcus	13
***Other (unclassified) species*:**	
Actinosporangium	30
Microellobosporia	11
Frankia	7
Westerdykella	6
Kitasatoa	5
Synnenomyces	4
Sebekia	3
Elaktomyces	3
Excelsospora	3
Waksmania	3
Alkalomyces	1
Catellatospora	1
Erythrosporangium	1
Streptoplanospora	1
Salinospora	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารที่สกัดได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ สำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคดังกล่าว จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทส์จัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์แหล่งสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและโอกาสที่จะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ยังคงมีอยู่สูง

ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์นั้นเพื่อเป็นแหล่งทรัพยากร (วัตถุดิบ) ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะนำไปศึกษาด้านเภสัชศาสตร์เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ตลอดจนทำการเก็บรักษาเชื้อ
2. เพื่อทำการหมักและสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์นั้น
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสิ่งสกัดหยาบนั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้
2. สามารถตรวจสอบลักษณะและพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์นั้นๆ
3. การวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สูง ซึ่งจะเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญทางสาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์เป็น แบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอคติ-โนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ10-50 คือเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอคติโนมัยซีทส์ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983) เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากมีหลายสกุลได้แก่ *Dactylosporangium, Streptoverticillium, Actinoplanes, Actinomadura, Streptosporangium, Saccharopolyspora, Chainia, Nocardiopsis, Ampullariella, Amycolatopsis, Kitasatosporia, Pseudonocardia, Saccharothrix, Microtetraspora, Microellobosporia, Streptoalloteichus, Actinosporangium, Kibdelosporangium, Actinosynema, Planobispora, Microbispora, Planomonospora* และ *Saccharomonospora* (Oki, 1994)

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในระดับสกุลและสปีชีส์อาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี(Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่ 3) เช่น Cell wall chemotype, Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบ Bioinformatic มาเพื่อช่วยตัดสินการจัดอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

การค้นพบยาชนิดต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีประวัติความเป็นมายาวนาน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และพืชซึ่งอาจได้จากการผ่าเหล่า(mutation) หรือจากวิวัฒนาการ หรือได้จากกระบวนการ detoxification การมีแหล่งจุลินทรีย์ที่ไม่จำกัดจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย หรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากหลายสกุล (ตารางที่ 4) ดังนั้นการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินป่าพรุ และ/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือพื้นที่พรุในบริเวณดังกล่าว อาจจะมีโอกาสพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิม และคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อและและวิทยาศาสตร์สาธารณสุขได้ต่อไป

ตารางที่ 3. ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีสท์

Genus	Typical morphology	Wall chemotype	Sugar pattern	Phospholipid type
Streptomyces	Chains of spores on aerial hyphae	I	-	PII
Micromonospora	Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent	II	D	PII
Actinoplanes	Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent	II	D	PII
Nocardia	Unbranched-branched fragmenting susstrate and aerial hyphae	IV	A	PII
Actinomyces	Cocci-irregular rods-branching	V, VI	-	PII
Thermomonospora	Single spores often in cluster	III	C	PIV
Actinomadura	Short chains of arthrospores	III	B	PI
Streptosporangium and Microtetraspora	Stable substrate and aerial mycelium	III	B and C	PIV
Frankia	Multilocular sporangia	III	B ,C and E	PI
Nocardioides	Branching, fragmenting mycelium with aerial hyphae	I	-	PI
Actinobiapora	Pairs of spores on substrate	IV	*	PIV
Glycomyces	Short spore chains on aerial hyphae	II	D	PI
Intrasporangium	Fragmenting, branching mycelium	I	-	PI
Kibdelosporangium	Aerial sporangium-like structures	IV	A	PII
Kineosporia	Substrate mycelium	I	-	PIII
Nocardiopsis	Fragmenting hypae	III	C	PIII
Sporichthya	Aerial mycelium, motile spores	I	-	ND

* Novel sugar pattern comprising arabinose, galactose and xylose
ND, not determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces*

Compounds	Strains	Activity	References
SF 2809	*Dactylosporangium* sp.	Chymase inhibitor	Tani *et al.*, 2004
Madurastatins A_1, A_2, A_3	*Actinomadura madurae* IFM 0745	Antibacterial activity	Harada *et al.*, 2004
Diketopiperazine Sch 725418	*Micromonospora* sp.	Antimicrobial activity	Yang *et al.*, 2004
Ansamitocin	*Actinosynnema pretiosum*	Antibacterial activity	Lu *et al.*, 2004
IB-0028	*Actinomadura* sp.	Cytotoxic activity	Malet-Cascon *et al.*, 2003
Nocathiacin I, II, III	*Nocardia* sp. WW-12651	Antibacterial activity	Li *et al.*, 2003
3-O-mycarosylerythronolide B	*Saccharopolyspora erythraea*	Antibacterial activity	Cevallos *et al., 2003*
Chandrananimycins A-C	*Actinomadura* sp.	Antibacterial activity	Rajendra *et al.*, 2003
Bafilomycin C1	*Kitasatosporia cheerisanensis*	Antibacterial activity	Moon *et al.*, 2003
R 176502	*Micromonospora* sp.	Antimicrobial activity	Laakso *et al.*, 2003
Kosinostatin	*Micromonospora* sp.	Antibacterial activity	Furumi *et al.*, 2002
Hibarimicins	*Microbispora* sp.	Anticancer activity	Cho *et al.*, 2002
Propeptin	*Microbispora* sp.	Prolyl Endopeptidase inhibitor	Esumi *et al.*, 2002
SB-219383	*Micromonospora* sp.	Antibacterial activity	Greenwood *et al.*, 2002
Isochromanquinone	*Micromonospora* sp. SA246	Cytotoxic activity	Yeo *et al.*, 2002
Asterobactin	*Nocardia asteroides*	Antibacterial activity	Nemoto *et al.*, 2002
Cetoniacytone A	*Actinomyces* sp.	Cytotoxic activity	Schlorke *et al.*, 2002
Dithiolopyrrolone	*Saccharotrix* sp. SA233	Antimicrobial activity	Lamari *et al.*, 2002
Fluoroindolocarbazoles	*Saccharotrix aerocolonigenes*	Antibacterial activity	Lam *et al.*, 2001
Ammocidin	*Saccharotrix* sp.	Apoptosis inducer	Murakami *et al.*, 2001
Plaraflavins	*Saccharotrix* sp.	Antitumor	Vertesy *et al.*, 2001
Tyropeptins A and B	*Kitasatospora* sp. MK 993-df2	Proteasome inhibitor	Momose *et al.*, 2001
Brasilinolide B	*Nocardia brasilliensis*	Antifungal	Mikami *et al.*, 2000
Arisostatin A and B	*Micromonospora* sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi *et al.*, 2000
Nocardiones A and B	*Nocardia* sp.TP-A0248	Tyrosine phosphatase inhibitors	Otani *et al.*, 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Compounds	Strains	Activity	References
IB-96212 [1]	*Micromonospora* sp. L-25-ES25-008	Cytotoxic acitivity	Chimeno *et al.*,2000
SB-219383 [2]	*Micromonospora* sp. SB-219383	Tyrosyl t RNA synthetase inhibitor	Stefanska *et al.*, 2000
Arisostatins A and B [3]	*Micromonospora* sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi *et al.*, 2000
4'-*N*-methyl-5'-hydroxystaurosporine, 5'-Hydroxystaurosporine [4]	*Micromonospora* sp. L-31-CLCO-002	Antitumor activities	Hernandez *et al.*, 2000
GTRI-02 [5]	*Micromonospora* sp. SA246	Lipid peroxidation inhibitor	Yeo *et al.*,1998
YM-47515 [6]	*Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*	Antimicrobial activities	Sugawara *et al.*, 1997
Thiocoraline [7]	*Micromonospora* sp. L-13-ACM2-092	Antimicrobial activities	Romero *et al.*, 1997
1-Hydroxycrisamicin A [8]	*Micromonospora* sp. SA246	Antimicrobial activities	Yeo *et al.*,1997
Pyrrolosporin A [9]	*Micromonospora* sp. C39217-R109-7	Antimicrobial activities	Lam *et al.*, 1996
Antascomicins A, B, C, D and E [10]	*Micromonospora* sp.	Antagonize the immunosuppressive activity	Fehr *et al.*, 1996
Macquarimicin A [11], B [12], C [13] and Cochleamycin A[14]	*Micromonospora chalcea*	Antileukemia cell line P-388	Hochlowski *et al.*, 1996
Cororubicin [15]	*Micromonospora* sp. JY16	Cytotoxic acitivity	Ishigama *et al.*, 1994
16-membered lactone compound and izenamicin B_2 and B_3 [16]	*Micromonospora* sp. YS-02930K	-	Yasumuro *et al.*, 1994
Mycinamicin I and II [17]	*Micromonospora griseorubida* (FERM BP-705)	Antibacterial activity	Kinoshita *et al.*, 1992
Sibanomicin [18]	*Micromonospora* sp. SF2364	Antitumor activities	Itoh *et al.*, 1990
Dynemicins O [19], P [20], Q[21]	*Micromonospora chersina* M956-1	Antibacterial activity, Antitumor activity	Saitoh *et al.*, 1991
Citreamicin [22]	*Micromonospora citrea*	Antibacterial activity	Carter *et al.*, 1990
K-259-2 [23]	*Micromonospora olivasterospora* K-259	Inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase	Matsuda *et al.*, 1987
K-13 [24]	*Micromonospora halophytica* subsp. *exilisia* K-13	enzyme inhibitor	Kase *et al.*, 1987
Antromicin [25]	*Micromonospora olivasterospora*	Antibacterial activity	Odakura *et al.*, 1984
Sagamicin	*Micromonospora sagamiensis*	Antibacterial activity	Odakura *et al.*, 1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณป่าฝั่งตะวันตกของประเทศไทยในจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี ทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ในที่เย็น จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ

3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ ทำโดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสกุลนั้นๆ จากนั้นทำการแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora et al., 1995) โดยนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol และ ในรูปแบบ lyophilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆของเชื้อดังนี้

3.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlied, 1966) ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วย จุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ จากการศึกษานี้จะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

3.5 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% $CaCO_3$) โดยเติม inoculum 1% ของ seed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-12 วัน

3.6 การสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้ว (polarity) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate, MeOH และ n-Butanol ทำการ partition ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในแต่ละส่วน และนำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

หลังจากได้สิ่งสกัดหยาบในแต่ละส่วนแล้ว จะแบ่งสิ่งสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

3.7.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 8.1.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μL/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินแถบภาคตะวันตก 6 ตัวอย่างในเขตจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี นำมาทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ และนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.73- 7.52 ตามตารางที่ 5

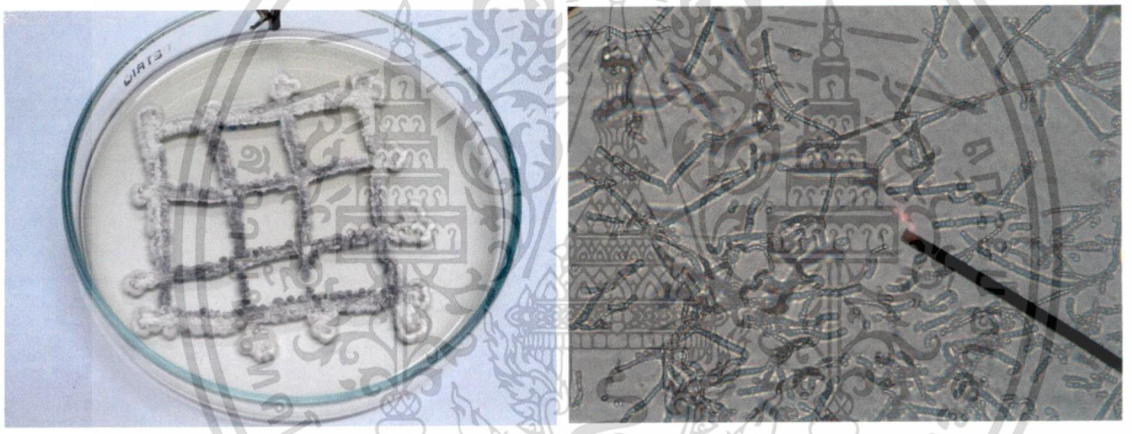
ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้แต่ละไอโซ เลต

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินร่วน	ราชบุรี	6.73	RB1	RB1-1, RB1-2, RB1-3, RB1-4, RB1-5, RB1-6, RB1-7, RB1-8, RB1-9, RB1-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13, RB1-14, RB1-15, RB1-16
ดินร่วนปนทราย	ราชบุรี	7.15	RB3	RB3-1, RB3-2, RB3-3, RB3-4, RB3-5, RB3-6, RB3-7, RB3-8, RB3-9, RB3-10
ดินจากซากพืช	ราชบุรี	6.88	RB5	RB5-1, RB5-2, RB5-3, RB5-4, RB5-5,RB5-6, RB5-7,RB5-8, RB5-9, RB5-10, RB5-11
เศษหินที่ผุกร่อน	กาญจนบุรี	7.52	KB2	KB2-1, KB2-2, KB2-3, KB2-4
ดินร่วน	กาญจนบุรี	7.24	KB4	KB4-1, KB4-2, KB4-3, KB4-4, KB4-5, KB4-6, KB4-7, KB4-8, KB4-9, KB4-10
ดินใต้ต้นไผ่	กาญจนบุรี	6.93	KB6	KB6-1, KB6-2, KB6-3, KB6-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาลดำ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สปอร์มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรงยาว มีจำนวนสปอร์ต่อสายมากกว่า 10 สปอร์ (รูปที่ 2, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 13 ไอโซเลต ได้แก่ RB1-5, RB1-6, RB1-7, RB1-8, RB1-14, RB1-15, RB1-16, RB3-3, RB3-4, RB3-5, RB3-6, RB3-7 และ RB3-8

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-6 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถตกตะกอนโปรตีนในนม (Coagulation) แต่ไม่ย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization) สามารถย่อยสลายเจลาติน และแป้งได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สมาชิกของเชื้อกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (ตารางที่ 8)



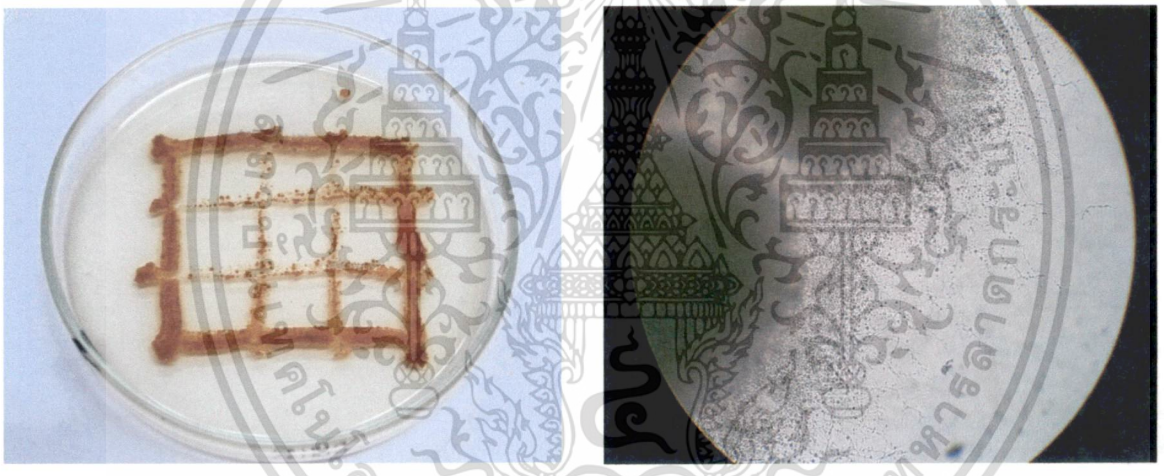
(A) **(B)**

รูปที่ 2. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่3, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 9 ไอโซเลต ได้แก่ RB1-9, RB1-10, RB5-1, RB5-2, RB5-3, RB5-4, KB4-3, KB4-4 และ KB4-5

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่สามารถย่อยแป้งได้เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ทุกไอโซเลตผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 8)



(A) (B)

รูปที่ 3. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน และสปอร์มีลักษณะกลมอยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) เกิดอยู่บนเส้นใยอากาศโดยตรง (รูปที่ 4, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 10 ไอโซเลต ได้แก่ KB4-1, KB4-2, KB4-8, KB4-9, KB4-10, RB1-11, RB1-12, RB1-13, RB3-9 และ RB3-10

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม ย่อยสลายแป้ง รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ได้ (ตารางที่ 8)

(A) (B)

รูปที่ 4. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวบนเส้นใยอาหารสีม่วง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นเกลียวสายสั้นๆ (น้อยกว่า 10 สปอร์ต่อสาย) แตกกิ่งก้านอยู่บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 5, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 4 ไอโซเลต ได้แก่ KB2-1, KB2-2, KB4-3 และ KB2-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและแป้ง แต่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus* ได้ (ตารางที่ 8)

(A) (B)

รูปที่ 5. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 5

84059
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอ่อนบนเส้นใยอาหารสีชมพูเข้มอมน้ำตาล สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน สปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นคู่เกิดอยู่บนก้านชูสปอร์ (sporophore) สั้นๆ ที่ติดอยู่กับเส้นใยอากาศ (รูปที่ 6, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 8 ไอโซเลต ได้แก่ RB5-5, RB5-6, RB5-7, RB5-8, KB6-1, KB6-2, KB6-3 และ KB6-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาตินและแป้งได้ รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้เช่นกัน เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Micrococcus luteus* และ *Candida albicans* ได้ (ตารางที่ 8)

(A) **(B)**

รูปที่ 6. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

ได้ทำการสกัดน้ำหมักเชื้อจากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ตามลำดับความเป็นขั้วได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และเอ็น-บิวทานอล ในส่วนของเซลล์ได้ทำการหมักโดยใช้เมทานอล ผลที่ได้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ สำหรับสารสกัดจากส่วนของตัวเซลล์ (สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล) สามารถแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้เช่นเดียวกัน แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต

จากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกได้ทั้ง 55 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นพบว่ามี 46 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่ 1 2 4 5 6 ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี แต่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ 9 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 3) ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 46 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีนั้น ในจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีนั้นพบว่ามี 11 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 1) ที่ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ มี 23 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 1, 5, 6) ที่ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* มี 21 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 1, 4) ที่ยับยั้ง *Bacillus subtilis* มี 19 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 1, 6) ที่ยับยั้ง *Escherichia coli* และมี 8 ไอโซเลต (กลุ่มที่ 6) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ได้ ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อทั้ง 46 ไอโซเลตนั้นมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ได้ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ[a]	สีของโคโลนีด้านบน[b]	สีของโคโลนีด้านล่าง[c]	รงควัตถุ[d]	สปอร์
1	RB1-1	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB1-2	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB1-3	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB1-4	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB3-1	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB3-2	ปานกลาง	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB5-9	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB5-10	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RB5-11	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB4-6	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB4-7	ดี	เทา	น้ำตาลเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
2	RB1-5	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-6	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-7	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-8	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-14	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-15	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	-	โซ่ตรงยาว
	RB1-16	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-3	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-4	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-5	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-6	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-7	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว
	RB3-8	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลดำ	-	โซ่ตรงยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ[a]	สีของโคโลนีด้านบน[b]	สีของโคโลนีด้านล่าง[c]	รงควัตถุ[d]	สปอร์
3	RB1-9	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	RB1-10	ดี	น้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	RB5-1	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	RB5-2	ดี	น้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	RB5-3	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	RB5-4	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	KB4-3	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	KB4-4	ดี	น้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
	KB4-5	ปานกลาง	ส้มอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล	-	กลมเดี่ยว
4	KB4-1	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	KB4-2	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	KB4-8	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	KB4-9	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	KB4-10	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	RB1-11	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	RB1-12	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	RB1-13	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	RB3-9	ดีมาก	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว
	RB3-10	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมใหญ่เดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ[a]	สีของโคโลนีด้านบน[b]	สีของโคโลนีด้านล่าง[c]	รงควัตถุ[d]	สปอร์
5	KB2-1	ปานกลาง	ขาว	ม่วง	เหลืองอ่อน	โซ่สั้นขดเป็นเกลียว
	KB2-2	น้อย	ขาว	ม่วง	เหลืองอ่อน	โซ่สั้นขดเป็นเกลียว
	KB2-3	ปานกลาง	ขาว	ม่วง	เหลืองอ่อน	โซ่สั้นขดเป็นเกลียว
	KB2-4	ปานกลาง	ขาว	ม่วง	เหลืองอ่อน	โซ่สั้นขดเป็นเกลียว
6	RB5-5	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	RB5-6	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	RB5-7	ปานกลาง	ชมพู	ชมพูเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	RB5-8	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	KB6-1	ปานกลาง	ชมพู	ชมพูเข้ม	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	KB6-2	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	KB6-3	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น
	KB6-4	ดี	ชมพู	ชมพูเข้มอมน้ำตาล	เหลืองอ่อน	กลมต่อเป็นคู่บนก้านชูสปอร์สั้น

หมายเหตุ **a** = การเจริญบนอาหารต่างๆ โดยรวม

b = สีโคโลนีด้านบนของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

c = สีโคโลนีด้านล่างของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

d = สีรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารต่างๆ โดยรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
1	RB1-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB1-2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB1-3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB1-4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB3-1	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	W	+	+	+	+	+	+	-
	RB3-2	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB5-9	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	W	+	+	+	+	+	+	-
	RB5-10	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	RB5-11	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	KB4-6	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	KB4-7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
2	RB1-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	RB1-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	RB1-7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	RB1-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	RB1-14	+	+	+	W	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB1-15	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB1-16	+	+	+	W	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB3-3	+	+	+	W	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB3-4	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB3-5	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB3-6	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	+	+	-	-	-
	RB3-7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	RB3-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.lutens*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
3	RB1-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RB1-10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	RB5-1	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-
	RB5-2	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-
	RB5-3	+	+	w	-	-	-	-	-	-	w	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-
	RB5-4	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-
	KB4-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	KB4-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	KB4-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
4	KB4-1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	KB4-2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	KB4-8	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	KB4-9	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	KB4-10	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	W	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	RB1-11	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	RB1-12	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	RB1-13	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	W	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	RB3-9	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	RB3-10	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
5	KB2-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	KB2-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	KB2-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	w	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	KB2-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
6	RB5-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	RB5-6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	RB5-7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	+	+	w	-	-	+	-	W	+	+	-	+	+	+	-	+
	RB5-8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	KB6-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	KB6-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	+	+	w	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	KB6-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	KB6-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+

หมายเหตุ + = positive reaction, - = negative reaction, w = weakly positive reaction

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อกลุ่มที่	สารสกัดหยาบ (50 มก/มล)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		Bacillus subtilis	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Candida albicans*
1	เฮกเซน (Hexane)	10	12	14.5	8	9	6.5
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	20	24	22	19	15	10.5
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	12	13	12	9.5	8.5	7
	เมทานอล (MeOH)	10	14	11	8.5	8	8
2	เฮกเซน (Hexane)	14	12	10	6.5	6.5	-
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	21	28	18	8	8	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	18	22	14	6.5	7	-
	เมทานอล (MeOH)	12	14	11	7	7	-
3	เฮกเซน (Hexane)	-	-	-	-	-	-
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	7	6.5	-	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	-	6.5	-	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	8.5	8	6.5	-	6.5	6.5
4	เฮกเซน (Hexane)	10	11	7	-	-	-
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	19	28	7	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	12	16	8	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	11	13	9.5	8	-	-
5	เฮกเซน (Hexane)	-	9	9	-	-	-
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	7	23	16	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	8	12	10	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	6.5	10	9.5	9	8.5	7.5
6	เฮกเซน (Hexane)	9	10	7	7	-	9
	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	18	21	15	13	-	14
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	10	13	9	10	-	10
	เมทานอล (MeOH)	12	11	8.5	8	-	9.5

หมายเหตุ * รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ = 6 มิลลิเมตร)

ขนาดของบริเวณการยับยั้งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากตัวอย่างดินในจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร Yeast extract - Malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีขาว เทา ส้ม และชมพูเข้ม สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีน้ำตาล ส้ม ม่วงและสีชมพูเข้ม ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือลักษณะตรง บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่และยังพบเชื้อที่มีการสร้างสปอร์แรงเจียมด้วย ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ออกเป็น 6 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีเทาและสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุสีเหลืองและสปอร์มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีขาวอมเทาและสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีน้ำตาลดำ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สปอร์มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรงยาว

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและสปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหารโดยตรง

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีขาวอมเทาและสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน พบสปอร์แรงเจียมเป็นลักษณะกลมเดี่ยวขนาดใหญ่บนเส้นใยอากาศ

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีขาว สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีม่วง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและสปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นสายโซ่สั้นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด 55 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลือง และสปอร์มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) (รูปที่ 1, ตารางที่ 6) มีสมาชิก 11 ไอโซเลต ได้แก่ RB1-1, RB1-2, RB1-3, RB1-4, RB3-1, RB3-2, RB5-9, RB5-10, RB5-11, KB4-6 และ KB4-7

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 4-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ตลอดจนสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (ตารางที่ 8)

(A) **(B)**

รูปที่ 1. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีชมพูและสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีชมพูเข้มอมน้ำตาล สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อนและสปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นคู่เกิดอยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ

ในการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้ทั้งในส่วนของเฮกเซน เอทิลอะซีเตต เอ็น-บิวทานอลและเมทานอลนั้นให้ผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยพบว่า ร้อยละ 83.6ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัดหยาบที่ได้นี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบทั้งสี่ส่วนที่สกัดได้ พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอล เมทานอลและเฮกเซน ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด คือ สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีฤทธิ์ครอบคลุมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด ส่วนสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์กลุ่มที่ 6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้ดีที่สุด

จากข้อมูลที่ได้ศึกษามาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าดินตัวอย่างของจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรีเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์สูง สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี จึงเหมาะสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ รวมถึงการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์
2. สารทุติยภูมิที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เหล่านี้สร้างมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ค่อนข้างดี จึงควรทำการวิจัยต่อในเชิงการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น เพื่องานวิจัยที่สมบูรณ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes*. Japan.

Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics*. 58: 1-26

Canedo, L.M.C., Blanco, J.A., Baz, J.P., Puentes, J.L., Millan, F.R., Vazquez, F.E. and Chimeno, R.I. 2000. 4'-*N*-Methyl-5'-hydroxystaurosporine, New Indolocarbazole Alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. strain. *J. Antibiotics*. 55: 895-902.

Carter, G. T., Nietsche, J. A., Williams, D. R. and Borders, D. B. 1990. Citreamicins, novel antibiotics from *Micromonospora citrea*: isolation, characterization, and structure determination. *J. Antibiotics*. 43: 504-512.

Cascon, L. M., Romero, F., Vazquez, F. E., Gravalos, D. and Puentes, J. L. 2003. IB-00208, a New Cytotoxic Polycyclic Xanthone Produced by a Marine-derived *Actinomadura*. I. Isolation of the Strain, Taxonomy and Biological Activites. *J. Antibiotics*. 56: 219-225.

Cevallos, A. and Guerriero, A. 2003. Isolation and Structure of a New Macrolide Antibiotic, Erythromycin G, and a Related Biosynthetic Intermediate from a Culture of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Antibiotics*. 56: 280-288.

Chimeno, R.I., Canedo, L.M.C., Espliego, F., Gravalos, D., Calle, F.C. and Puentes, J.L.F. 2000. IB-96212 a Novel Cytotoxic Macrolide Produced by a Marine *Micromonospora*. *J. Antibiotics*. 53: 474-478.

Cho, S.I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T. and Uehara, Y. 2002. Effects of Hibarimicins and Hibarimicin-Related Compounds Produced by *Microbispora* on v-Src Kinase Activity and Growth and Differentiation of Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiotics*. 55: 270-278.

Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.

Esumi, Y., Suzuki, Y., Itoh, Y., Uramoto, M., Kimura, K. I., Goto, M., Yoshihama, M. and Ichikawa, T. 2002. Propeptin, a New Inhibitor of Prolyl Endopeptidase Produced by *Microbispora*. II. Determination of Chemical Structure. *J. antibiot.* 55: 296-300.

Ferh, T., Sanglier, J. J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W. and Wioland, C. 1996. Novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. *J. Antibiotics*. 49: 230-234.

Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N. and Oki, T. 2002. Kosinostatin, a Quinocycline Antibiotic with Antitumor Activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J. Antibiotics*. 55: 128-133.

Goodfellow, M. and Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Greenwood, R. C. and Gentry, D. R. 2002. Confirmation of the Antibacterial Mode of Action of SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor froma *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics.* 55: 423-426.

Harada, K., Tomita, K., Fujii, K., Masuda, K., Mikami, Y., Yazawa, K. and Komaki, H. 2004. Isolation and Structural Characterization of Siderophores, Madurastatins, Produced by a Pathogenic *Actinomadura madurae. J. Antibiotics.* 57: 125-135.

Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Henry, R., Whittern, D. M. and McALPINE, J. 1995. Macquarimicins, Microbial metabolites from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics.* 48: 467-470.

Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Houge-Frydrych, C., Readshaw, S. A. and BELL, D. J. 2000. SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from a *Micromonospora* sp. II. Structure Determination. *J. Antibiotics.* 53: 351-356.

Igarashi, Y., Takagi, K., Kan, Y., Fujii, K., Harada, K. I., Furumai, T. and Oki, T. 2000. Arisostatins A and B, New Members of Tetrocarcin Class of Antibiotics from *Micromonospora* sp. TP-A0316. II. Structure Determination. *J. Antibiotics.* 53: 233-240.

Ishigami, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. 1994. Cororubicin, a new anthracycline antibiotic generating active oxygen in tumor cell. *J. Antibiotics.* 47: 1219-1225.

Itoh, J., Watabe, H. O., Ishii, S., Gomi, S., Nagasawa., Yamamoto, H., Shomura, T., Sezaki, M. and Kondo, S. 1990. Sibanomicin, a new pyrrolo[1,4]-benzodiazepinen antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp.. *J. Antibiotics.* 41: 1281-1284.

Kase, H., Kaneko, M. and Yamada, K. 1987. K-13, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Micromonospora halophytica* subsp. *exilisia. J. Antibiotics.* 40: 450-454.

Kinoshita, K., Takenaka., Suzuki, H., Morohoshi, T. and Hayashi, M. 1992. Mycinamicins, new macdrolide antibiotics XIII. Isolation and structures of novel fermentation products from *Micromonospora griseorubida* (FERM BP-705). *J. Antibiotics.* 45: 1-9.

Laakso, J. A., Mocek, U. M., Dun, J. V., Wouters, W. and Janicot, M. 2003. R176502, a New Bafilolide Metabolite with Potent Antiproliferative Activity from a Novel *Micromonospora* Species. *J. Antibiotics.* 56: 909-916.

Lam, K. S., Hesler, G. A., Gustavson, D. R., Berry, R. L., Tomita, K., MacBeth, J. L., Ross, J., Miller, D. and Forenza, S. 1996. Pyrrolosporin A, a new antitumor antibiotic from *Micromonospora* sp. C39217-R109-7. *J. Antibiotics.* 49: 866-872.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Colson, K. L., Matson, J. A., Rose, W. C., Doyle, T. W. and Forenza, S. 2001. Production, Isolation and Structure Determination of Novel Fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiotics*. 54: 1-9.

Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. P. 2002. New Dithiolopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 55: 696-701.

Leet, J. E., Li, W., Ax, H. A., Matson, J. A., Huang, S., Huang, R., Cantone, J. L., Drexler, D., Dalterio, R. A. and Lam, K. S. 2003. Nocathiacins, New Thiazolyl Peptide Antibiotics from *Nocardia* sp. II. Isolation, Characterization, and Structure Determination. *J. Antibiotics*. 56: 232-242.

Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. pp. 161-207. Baltimore: The Williams &Wilkins.

Lu, C., Bai, L., and Shen, Y. 2004. A Novel Amide N-Glycoside of Ansamitocins from *Actinosynnema pretiosum*. *J. Antibiotics*. 57: 348-350.

Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H. and Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *J. Antibiotics*. 56: 622-629.

Matsuda, Y., Asano, K. and Kawamoto, I. 1987. K-259-2, A a new inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *J. Antibiotics*. 40: 1092-1100.

Mikami, Y., Komaki, H., Imai, T., Yazawa, K., Nemoto, A., Tanaka, Y. and Grafe, U. 2000. A New Antifungal Macrolide Component, Brasilinolide B, Produced by *Nocardia brasiliensis*. *J. Antibiotics*. 53: 70-74.

Momose, I., Sekizawa, R., Hashizume, H., Kinoshita, N., Homma, Y., Hamada, M., Iinuma, H. and Takeuchi, T. 2001. Tyropeptins A and B, New Proteasome Inhibitors Produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Taxonomy, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 54: 997-1003.

Moon, S. S., Hwang, W. H., Chung, Y. R. and Shin, J. 2003. New Cytotoxic Bafilomycin C1-amide Produced by *Kitasatospora cheerisanensis*. *J. Antibiotics*. 56: 856-861.

Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-ya, K., Shiozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H. and Hayakawa, Y. 2001. Ammocidin, a New Apoptosis Inducer in Ras-dependent Cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiotics*. 54: 710-717.

Nemoto, A., Hoshino, Y., Yazawa, K., Ando, A., Mikami, Y., Komaki, H., Tanaka, Y. and Grafe, U. 2000. Asterobactin, a New Siderophore Group Antibiotic from *Nocardia asteroides*. *J. Antibiotics*. 55: 593-597.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Odakura, Y., Kase, H., Itoh, S., Satoh, S., Takasawa, S., Takahashi, K., Shirahata, K. and Nakayama, K. 1984. Biosynthesis of astromicin and related antibiotics. *J. Antibiotics*. 37: 1670-1680.

Odakura, Y., Kase, H. and Nakayama, K. 1983. Sagamicin and the related aminoglycosides: fermentation and biosynthesis. *J. Antibiotics*. 36: 125-130.

Otani, T., Sugimoto, Y., Aoyagi, Y., Igarashi, Y., Furumai, T.,Saito, N., Yamada, Y., Asao, T. and Oki, T. 2000. New Cdc25B Tyrosine Phosphatase Inhibitors, Nocardiones A and B, Produced by *Nocardia* sp. TP-A0248: Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structural Elucidation and Biological Properties. *J. Antibiotics*. 53: 337-344.

Romero, F., Espliego, F., Baz, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F. C. and Puentes, J. L. F. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. *J. Antibiotics*. 50: 734-737.

Saitoh, M. M., Morisaki, N., Tokiwa, Y. and Iwasaki, S. 1991. Dynemicins O, P and Q: novel antibiotics related to dynemicin A isolation, characterization and biological activity. *J. Antibiotics*. 44: 1037-1044.

Shanson, D.C. 1982. *Microbiology in Clinical Practice*. Wright PSG, London., p. 36.

Shiring, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

Skehan, P., Storeng, R., Scdiero, D., Mark, S.A., McMahan, S., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.

Stefanska, A.L., Coates, N.J., Mensah, L.M., Pope, A.J., Ready, S.J. and Warr, S.R. 2000. SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from a *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 53: 345-350.

Sugawara, T., Tanaka, A., Imai, H., Nagai, K. and Suzuki, K. 1997. YM-47515, a Novel Isonitrile Antibiotic from *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*. *J. Antibiotics*. 50: 944-948.

Tani, M., Harimaya, K., Gyobu, Y., Sasaki, T., Takenouchi, O., Takashi, A., Kawamura, A., Kamimura, T. and Harada, T. 2004. SF2809 Compounds, Novel Chymase Inhibitors from *Dactylosporangium* sp. *J. Antibiotics*. 57: 89-96.

Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology, An Introduction*. 5th ed. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Umezawa, H. 1978. *Index of Actinomycetes Antibiotics,* USACO Corporation, Tokyo.

Verlander, C.P. 1992. Detection of horseradish peroxidase by colorimetry, *In Nonisotopic DNA ProbeTechnique*, pp.185-201. Edited by L.J. Kricka. New York: Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vertesy, L., Barbone, F. P., Cashmen, E., Decker, H., Ehrlich, K., Jordan, B., Knauf, M., Schummer, D., Segeth, M. P., Wink, J. and Seibert, G. 2001. Pluraflavins, Potent Antitumor Antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiotics*. 54: 718-729.

Yang, S. W., Chan, T. M., Terracciano, J., Loebenberg, D., Chen, G., Patel, M., Gullo, V., Pramanik,B. and Chu, M. 2004. Structure Elucidation of a New Diketopiperazine Sch 725418 from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 57: 345-347.

Yasumuro, K., Shibazaki, M., Sasaki., Imai, H., Yamaguchi, H., Suzuki, K. and Morioka, M. 1994. 16-membered lactone compounds from izenamicins-producing *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 47: 250-252.

Yeo, W.H., Lee, O.K., Yun, B.S., Woo, J.S., Kim, Y.K., Park, E.K., Kim, S.S., Kim, Y.H., Kim, S.K.,Yoo, I.D., Whang, K.S. and Yu, S.H. 1998. 1-Hydroxycrisamicin A, a new Isochromanquinone antibacterial Antibiotic, Produced by *Micromonospora* sp. SA246. *J. Antibiotics*. 51: 82-84.

Yeo, W. H., Yun, B. S., Kim, Y. H., Yu, S. H., Kim, H. M., Yoo, I. D. and Kim, Y. H. 2002. GTRI-BB, a New Cytotoxic Isochromanquinone Produced by *Micromonospora* sp. SA-246. *J. Antibiotics*. 55: 511-515.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้