

# รายงานการวิจัย

## เรื่อง

การศึกษาการกระจายตัวและคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถสร้างสาร  
ปฏิชีวนะจากสิ่งแวดล้อมทางทะเล

**Distribution and Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes  
isolated from marine environments**



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน  
ประจำปีงบประมาณ 2552  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท่าวัว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) แอคติโนมัยซีทที่ส่งเสริมการเจริญของพืชและลักษณะทาง  
อนุกรมวิธานของเชื้อเหล่านั้น

(ภาษาอังกฤษ) Distribution and Screening of Antibiotic-Producing  
Actinomycetes isolated from marine environments

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณ  
แผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ประจำปี 2552 จำนวนเงิน 200,000 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เดือนตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2552  
ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. จิตติ ท่าไผ่  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
โทรศัพท์ 02-3298400 ต่อ 235

#### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 50 ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างดินและตะกอนดินใต้ทะเลบริเวณจังหวัด  
ตราด ตรัง ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ และสุราษฎร์ธานี เชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่ม  
โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ  
เชื้อจุลินทรีย์เป็น 5 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces yatensis*  
มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces lusitanus* DSM 40568<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับ  
ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.6 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 มี  
ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces olivaceus* DSM 40072<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึง  
ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับ  
เชื้อ *Micromonospora endolithica* DSM 44398<sup>T</sup> (AJ560635) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับ  
นิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ  
*Streptomyces caesioides* DSM 40419<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์  
(%similarity) ร้อยละ 99.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อที่แสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 95 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 95 โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 1 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้อย่างมีนัยสำคัญ การใช้ประโยชน์จากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเลที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะที่แยกได้ในครั้งนี้ อย่างมีศักยภาพ ต้องการการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

#### Abstract

Fifty actinomycete isolates were isolated from soil and sediments in Trad, Trang, Rayong, Prachokkereeekhun and Surajthani province, Thailand. These isolates could be grouped by morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into five groups. The actinomycetes in group I was close to *Streptomyces yatensis* (99.2%). Group II was close to *Streptomyces lusitanus* (99.6%). Group III was close to *Streptomyces olivaceus* (99.5%). Group IV was close to *Micromonospora endolithica* (99.1%). This group produced single spore directly on orange substrate mycelia. Group V was close to *Streptomyces caesiis* (99.8%). In this study, ninety five actinomycete isolates (95%) exhibited the antimicrobial activities. The actinomycetes in group I showed the significant ability to inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Potential use to these antibiotic producing marine actinomycete isolates need further study for antibiotic development.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	12
3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ	12
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง	12
3.1.2 การแยกเชื้อ	12
3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์	12
3.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น	12
3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ	13
3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี	13
3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ	13
3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์	13
3.2.2.2 การวิเคราะห์ whole cell sugar	14
3.2.2.3 การวิเคราะห์ polar lipid	14
3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง	
16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition	14
3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์	14
3.2.4.2 การวิเคราะห์	15
3.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์	15
3.3.1 ฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ	16
กลุ่มที่ 1	17
กลุ่มที่ 2	21
กลุ่มที่ 3	24
กลุ่มที่ 4	26
กลุ่มที่ 5	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	46

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอสกีโนมัยซีท	4
2	แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ	7
3	สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอสกีโนมัยซีทส์ที่หายากนอกเหนือจากสกุล <i>Streptomyces</i>	8
4	แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอสกีโนมัยซีทส์ที่แยกได้	16
5	ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสกีโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	32
6	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสกีโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต TR5-1	18
2	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต TR5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	20
3	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต TD1-1	21
4	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต TD1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	23
5	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต TD2-1	24
6	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต TD2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	25
7	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต RY6-1	26
8	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RY6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	28
9	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PJ13-1	29
10	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PJ13-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

*B. subtilis* = *Bacillus subtilis*

*C. albicans* = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

*E. coli* = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

IAA = Indole acetic acid

ISP = International *Streptomyces* Project

*M. luteus* = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-*Streptomyces* Actinomycetes

*Ps. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

*S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมนุษย์มีความต้องการหายาใหม่ เพื่อนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้มีการพัฒนาขบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์จนสามารถต้านยาที่ใช้กันอยู่ได้มากขึ้น ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงหันมาทำการแสวงหาวัตถุดิบหรือทรัพยากรเพื่อนำมาใช้ผลิตยาต้านจุลินทรีย์ก่อโรคนชนิดใหม่กันอยู่เสมอ จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะอย่างสูง ท่ามกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทส์จัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Berdy, 2005)

แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมีไมซีเลียมแตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทส์ที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactyloporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdelloporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005) แอกติโนมัยซีทส์สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะในดินบนบก สิ่งมีชีวิตชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายซากพืชและสัตว์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ

การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอกติโนมัยซีทส์หายากสกุลอื่น ๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและการกระจายตัว (distribution) ของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จากดินชายฝั่งและดินตะกอนใต้ทะเลบริเวณจังหวัดตราด ระบุของประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานีและตรัง และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากแหล่งดินต่างๆ ของทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน
- 1.2.3 เพื่อศึกษาคุณลักษณะต่างๆ รวมทั้งศึกษาอนุกรมวิธานระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้
- 1.2.4 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทางทะเลที่แยกได้

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลทั้งทางด้านฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน เพื่อรวบรวมนำมาศึกษาอนุกรมวิธานในระดับสกุล เป็นส่วนใหญ่และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไฮโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์ ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารทุติยภูมินั้น

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์

ทราบข้อมูลการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทางทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามันและสามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในระดับสกุลได้ เพื่อเก็บไว้เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตหรือพัฒนาเป็นสารปฏิชีวนะที่สำคัญในอนาคต ตลอดจนทราบข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ที่คัดเลือกผลิตได้ ซึ่งสามารถนำไปให้หน่วยงานของรัฐและเอกชนที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป

## 1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวิทยาศาสตร์สาธารณสุขด้านการค้นคว้าวิจัยหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อโรคคือยาที่เป็นปัญหาสาธารณสุขปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

ทะเลจัดเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลก เนื่องจากมีพื้นที่คิดเป็นสองในสามของพื้นที่ทั้งหมด ดังนั้นใต้ท้องทะเลจึงมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมาก ตลอดจนยังเป็นสถานที่ลับที่คอยให้มนุษย์ทำการศึกษา ในสิ่งมีชีวิตทั้งหมดทั้งมวลในท้องทะเล แบคทีเรียจากทะเลจัดเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญแหล่งหนึ่ง แบคทีเรียจากทะเลมักจะดำรงชีวิตเป็นอิสระอยู่ในน้ำ ดิน ดินตะกอนใต้ทะเลหรืออาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในทะเล (symbiosis) โดยที่แบคทีเรียกลุ่มที่สำคัญที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือ กลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ซึ่งพบได้มากในน้ำทะเลและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง สำหรับเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สกุล *Streptomyces* นั้นเป็นกลุ่มที่พบได้มากที่สุดในทะเล รองลงมาคือเชื้อในสกุล *Micromonospora* เชื้อทั้งสองสกุลที่กล่าวมานี้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด ในบรรดากลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ทั้งหลาย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสารถูกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ (Bérdy, 2005)

<b><i>Streptomycetaceae:</i></b>		<b><i>Thermomonosporaceae:</i></b>	
<i>Streptomyces</i>	~8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatosporia</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellbosporia</i>	11	<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
<b><i>Micromonosporaceae:</i></b>		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
( <i>Actinoplanetes</i> )		<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Thermopolyspora</i>	1
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Dactylosporangium</i>	58		
<b><i>Micromonosporaceae</i> (ต่อ)</b>		<b><i>Mycobacteriaceae:</i></b>	
<i>Ampullariella</i>	9	( <i>Actinobacteria</i> )	
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Nocardia</i>	(357)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Arthrobacter</i>	25
		<i>Brevibacterium</i>	17
<b><i>Pseudonocardiaceae:</i></b>		<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357		
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<b><i>Other (unclassified) species:</i></b>	
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycolata</i>	12	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Frankia</i>	7
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Westerdykella</i>	6
		<i>Kitasatoa</i>	5
<b><i>Streptosporangiaceae:</i></b>		<i>Synnemonyces</i>	4
( <i>Maduromycetes</i> )		<i>Sebekia</i>	3
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Excelsospora</i>	3
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Waksmania</i>	3
<i>Planobispora</i>	10	<i>Alkalomyces</i>	1
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Catellatospora</i>	1
<i>Planomonospora</i>	2	<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1

การศึกษาศาสตร์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ยังมีความน่าสนใจอีกประการตรงที่สามารถเพิ่มผลผลิตสารสำคัญเหล่านั้นได้ในห้องปฏิบัติการ ในบางครั้งการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากทะเลนั้นอาจจะมีข้อจำกัด เนื่องจากมีความแตกต่างกันทางด้านที่อยู่อาศัย ดังนั้นเทคนิค วิธีการ และสารอาหารที่จะใช้เพาะเลี้ยงจึงมีความแตกต่างจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทส์บนบก ซึ่งบางครั้งอาจต้องใช้กระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพและเคมีก่อนที่จะทำการแยกเชื้อต่างๆ เพื่อที่จะครอบคลุมเชื้อที่จะได้จริง

จากลักษณะอันจำเพาะของทะเลไทย ที่ยังคงความเป็นธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ กอปรกับมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีสัตว์และพืชทะเลจำนวนมาก ดังนั้นแนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จึงน่าจะมียู่สูง และมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแหล่งอื่น โอกาสที่จะค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ผลิตสารธรรมชาติที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนจึงมีโอกาสมากขึ้นยิ่งนัก นอกจากนี้แล้วยังพบว่า การศึกษาวิจัยสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ทางทะเลในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาระยะกระจายตัวและคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ ๆ จากทรัพยากรในประเทศไทย

ดังที่กล่าวมาข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาทำการศึกษาระยะกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ทางทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน เพื่อตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานระดับสกุลและคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นผลการวิจัยในเบื้องต้นที่จะช่วยคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ทางทะเลที่น่าสนใจ รวมทั้งได้ข้อมูลของการศึกษาระยะกระจายตัวและข้อมูลทางอนุกรมวิธาน ตลอดจนข้อมูลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ทางทะเลชนิดต่างๆ ซึ่งจะเป็ประโยชน์สามารถนำไปศึกษาวิจัยในระดับต่อไปเพื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งการศึกษาวินิจฉัยจะช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยกอนุกรมวิธาน การเพาะเลี้ยงและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ทางทะเล เพื่อช่วยเพิ่มขีดความสามารถหรือทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

ปัจจุบันอุบัติการณ์การก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้นทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังที่ปรากฏในข่าวจากสื่อต่างๆ ของการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนิวโมโมซิสยังผลให้เกิดการเสียหายต่อชีวิต ทรัพย์สิน และเศรษฐกิจทางการเกษตรโดยรวม แนวทางแก้ปัญหาแนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อโรคก่อโรคนิวโมโมซิส จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งที่สำคัญ (ตารางที่ 2, 3) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ (Bérdy, 2005)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่หายากนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces*

Compounds	Strains	Activity	References
SF 2809	<i>Dactyloporangium</i> sp.	Chymase inhibitor	Tani <i>et al.</i> , 2004
Madurastatins A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>	<i>Actinomadura madurae</i> IFM 0745	Antibacterial activity	Harada <i>et al.</i> , 2004
Diketopiperazine Sch 726418	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Yang <i>et al.</i> , 2004
Ansamitocin	<i>Actinosynnema pretiosum</i>	Antibacterial activity	Lu <i>et al.</i> , 2004
IB-0028	<i>Actinomadura</i> sp.	Cytotoxic activity	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2003
Nocathiacin I, II, III	<i>Nocardia</i> sp. WW-12651	Antibacterial activity	Li <i>et al.</i> , 2003
3-O-mycarosylerythronolide B	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Antibacterial activity	Cevallos <i>et al.</i> , 2003
Chandrananimycins A-C	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacterial activity	Rajendra <i>et al.</i> , 2003
Bafilomycin C1	<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	Antibacterial activity	Moon <i>et al.</i> , 2003
R 176502	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Laakso <i>et al.</i> , 2003
Kosinostatin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Furum <i>et al.</i> , 2002
Hibarimicins	<i>Microbispora</i> sp.	Anticancer activity	Cho <i>et al.</i> , 2002
Propeptin	<i>Microbispora</i> sp.	Prolyl Endopeptidase inhibitor	Esumi <i>et al.</i> , 2002
SB-219383	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Greenwood <i>et al.</i> , 2002
Isochromanquinone	<i>Micromonospora</i> sp. SA216	Cytotoxic activity	Yeo <i>et al.</i> , 2002
Asterobactin	<i>Nocardia asteroides</i>	Antibacterial activity	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Cetoniacytone A	<i>Actinomyces</i> sp.	Cytotoxic activity	Schlorke <i>et al.</i> , 2002
Dithiopyrrolone	<i>Saccharotrix</i> sp. SA233	Antimicrobial activity	Lamari <i>et al.</i> , 2002
Fluoroindolocarbazoles	<i>Saccharotrix aerocolonigenes</i>	Antibacterial activity	Lam <i>et al.</i> , 2001
Ammocidin	<i>Saccharotrix</i> sp.	Apoptosis inducer	Mjurakami <i>et al.</i> , 2001
Plarallavins	<i>Saccharotrix</i> sp.	Antitumor	Vertesy <i>et al.</i> , 2001
Tyropeptins A and B	<i>Kitasatospora</i> sp. MK 993-df2	Proteasome inhibitor	Momose <i>et al.</i> , 2001
Brasilinolide B	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Antifungal	Mikami <i>et al.</i> , 2000
Arisostatin A and B	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi <i>et al.</i> , 2000
Nocardiones A and B	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0248	Tyrosine phosphatase inhibitors	Otani <i>et al.</i> , 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่หายากนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces* (ต่อ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแอกติโนมัยซีทส์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะเนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนีสายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัยซีทส์ ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983)

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในระดับสกุลและสปีชีส์อาศัยลักษณะทางฟิโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่ 1) เช่น Cell wall chemotype, Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatic) มาเพื่อช่วยตัดสินใจการจำแนกอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

การค้นพบสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีประวัติความเป็นมายาวนานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และพืชซึ่งอาจได้จากการผ่าเหล่า (mutation) หรือจากวิวัฒนาการ หรือได้จากกระบวนการ detoxification การมีแหล่งจุลินทรีย์ที่ไม่จำกัดจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลายหรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินชายฝั่งและดินตะกอนใต้ท้องทะเล อาจจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิม ยังผลให้มีโอกาสในการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพิ่มสูงขึ้น

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อค้นหาเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการศึกษาระยะกระจายตัวและอนุกรมวิธานของเชื้อเหล่านั้น ซึ่งคาดว่า การวิจัยในครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่น่าสนใจหรือเป็นเชื้อชนิดใหม่เพื่อใช้เป็นแหล่ง

ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยาปฏิชีวนะและการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตได้ต่อไปในอนาคต จึงนับเป็นการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ธรรมชาติให้ก่อประโยชน์ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาระบบฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมของชาติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณชายหาดและดินตะกอนใต้ทะเลในเขตจังหวัดตราด ระบุของประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และตรัง ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่างประมาณ 20 ตัวอย่าง คาดว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ประมาณ 100 ไอโซเลต และจะทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อที่จะนำมาทำการศึกษาต่อไป

การเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างดินและตะกอนดินใต้ทะเลปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita et.al. (1986)

##### 3.1.2 การแยกเชื้อ

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

##### 3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol

##### 3.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

### 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

#### 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบโดยการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษาจะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

#### 3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว Yeast extract – Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อโดยการ centrifuge และทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

##### 3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

ตรวจสอบ Diaminopimelic acid ของเชื้อ โดยสลายเซลล์แห้งด้วย 6N HCl ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC (Merck No. 5716) Develop ด้วย methanol - water - 6N HCl - pyridine(80:26:4:10) ใช้ 0.5% ninhydrin solution ใน n-butanol ฟันแล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

### 3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)<sub>2</sub> และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูเอา supernatant มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่เกิดกับ standard

### 3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

เตรียม polar lipid จากการสกัดเซลล์แห้งด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย chloroform กรองกากเซลล์ (debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และจุดสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10x10 cm) ทำการ develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform - methanol - water (65:25:4) และ chloroform - acetic acid - methanol - water (80:18:12:5) แล้วฟันด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

### 3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST n program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

### 3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka, J., 1994.)

#### 3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract - Malt extract broth เป็นเวลา 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อ และล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และ โปรตีน ด้วยการเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RNase solution และ proteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่  $-20$  องศาเซลเซียส ใน ethanol

### 3.2.4.2 การวิเคราะห์

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส  $10 \mu\text{l}$  heated DNA ( $1 \text{ mg/ml}$ ) ด้วย  $10 \mu\text{l}$  nuclease P<sub>1</sub> บ่มที่อุณหภูมิ  $50$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $1$  ชั่วโมง และไฮโดรไลสต่อด้วย  $10 \mu\text{l}$  alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ  $37$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $1$  ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

## 3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

### 3.3.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื่อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate  $3$  ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ  $20 \mu\text{l}/\text{disc}$  ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ  $37$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $1$  วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอนจากบริเวณใต้ท้องทะเลและชายฝั่ง จังหวัดตราด ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และตรัง นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสปีทหายากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสปีททั้งหมด 100 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.84- 7.95 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่แยกได้

ชนิดของ ตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัส ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินชายหาด	ตราด	8.27	TD 1	TD1-1, TD1-2, TD1-3, TD1-4, TD1-5, TD1-6, TD1-7
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ตราด	8.30	TD2	TD2-1, TD2-2, TD2-3, TD2-4, TD2-5
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ตราด	8.14	TD3	TD3-1, TD3-2, TD3-3, TD3-4, TD3-5, TD3-6
ดินชายหาด	ระยอง	7.84	RY4	RY4-1, RY4-2, RY4-3, RY4-4, RY4-5
ดินชายหาด	ระยอง	7.64	RY5	TR5-1, TR5-2, TR5-3, TR5-4
ทรายริมหาด	ระยอง	7.71	RY6	RY6-1, RY6-2, RY6-3, RY6-4, RY6-5
ดินเลน	ระยอง	7.74	RY7	RY7-1, RY7-2, RY7-3, RY7-4, RY7-5, RY7-6, RY7-7
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ระยอง	7.82	RY8	RY8-1, RY8-2, RY8-3, RY8-4, RY8-5
ทรายริมหาด	ประจวบคีรีขันธ์	7.66	PJ9	PJ9-1, PJ9-2, PJ9-3, PJ9-4, PJ9-5, PJ9-6, PJ9-7
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ประจวบคีรีขันธ์	7.42	PJ10	PJ10-1, PJ10-2, PJ10-3, PJ10-4, PJ10-5
ดินตะกอน	ประจวบคีรีขันธ์	7.99	PJ11	PJ11-1, PJ11-2, PJ11-3, PJ11-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่แยกได้ (ต่อ)

ชนิดของ ตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัส ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินชายหาด	ประจวบคีรีขันธ์	7.91	PJ12	PJ12-1, PJ12-2, PJ12-3, PJ12-4, PJ12-5
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ประจวบคีรีขันธ์	7.81	PJ13	PJ13-1, PJ13-2, PJ13-3
ตะกอนดินใต้ ทะเล	สุราษฎร์ธานี	8.14	SR14	SR14-1, SR14-2, SR14-3, SR14-4
ดินชายหาด	สุราษฎร์ธานี	8.27	SR15	SR15-1, SR15-2, SR15-3, SR15-4
ทรายริมหาด	สุราษฎร์ธานี	7.10	SR16	SR16-1, SR16-2, SR16-3, SR16-4, SR16-5
ดินเลน	สุราษฎร์ธานี	7.61	SR17	SR17-1, SR17-2, SR17-3, SR17-4
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ตรัง	7.82	TR18	TR18-1, TR18-2, TR18-3, TR18-4, TR18-5
ทรายริมหาด	ตรัง	7.88	TR19	TR19-1, TR19-2, TR19-3, TR19-4, TR19-5
ตะกอนดินใต้ ทะเล	ตรัง	7.52	TR20	TR20-1, TR20-2, TR20-3, TR20-4, TR20-5

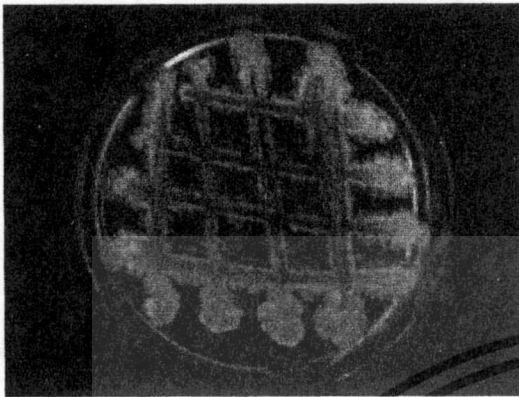
#### 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ทั้งหมด 100 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

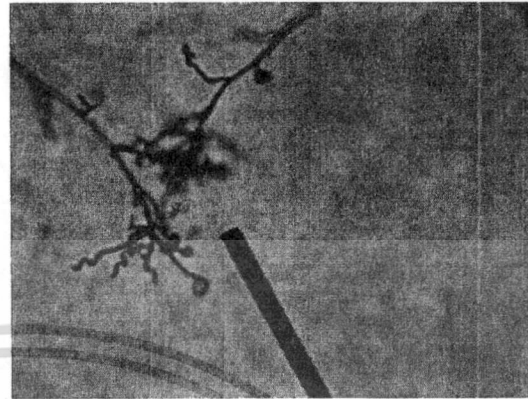
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีม่วงอมเทา เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน สร้างรงควัตถุสีเหลืองและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 26 ไอโซเลต ได้แก่ TR5-1, TR5-2, TR5-3, TR5-4, PJ9-1, PJ9-2, PJ9-3, PJ9-4, PJ9-5, PJ9-6, PJ9-7, PJ11-1, PJ11-2, PJ11-3, PJ11-4, PJ12-1, PJ12-2, PJ12-3, PJ12-4, PJ12-5, SR14-1, SR14-2, SR14-3, SR14-4, SR15-1, SR15-2

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนมรวมทั้งเจลาตินได้ สามารถเปลี่ยน

ไนเตรทเป็นไนโตรที่ได้อ และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *C. albicans* ได้



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 1 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TR5-1

ก) เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

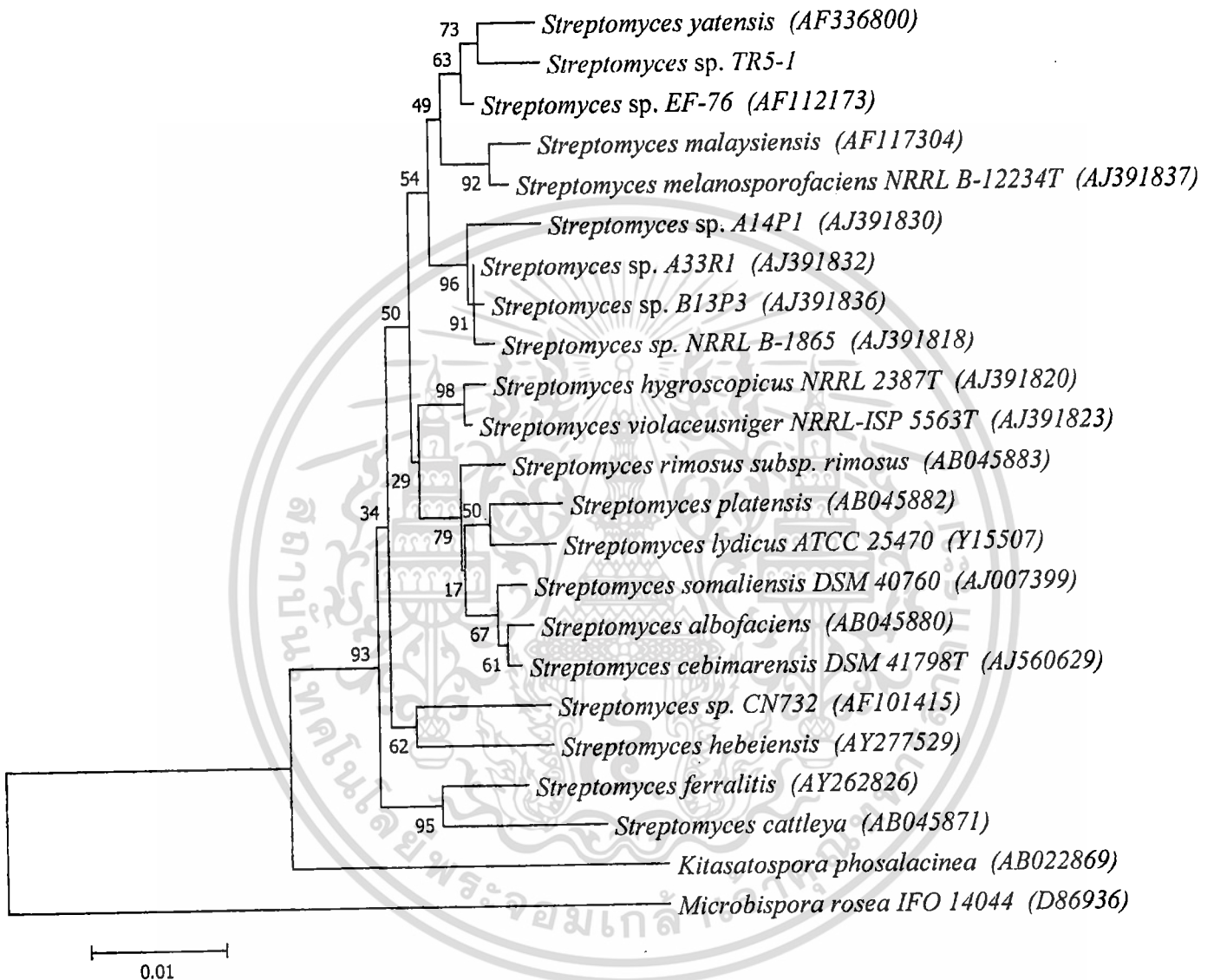
### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพิมิ ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดใน เซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติ ดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติ ดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณ เบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70-71 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TR5-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TR5-1 มีความ คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces yatensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอ ไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.2 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ ร้อยละ 73 (รูปที่ 2)



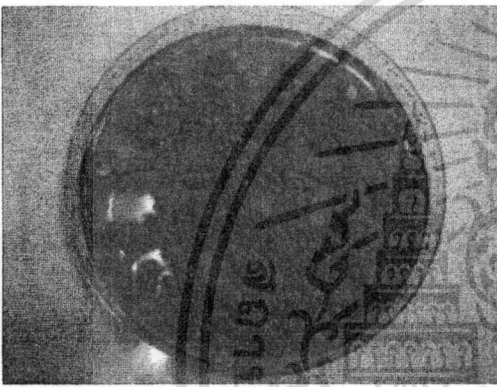


รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อ ไอโซเลต TR5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาล สร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อนและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) มีสมาชิกจำนวน 25 ไอโซเลต ได้แก่ TD1-1, TD1-2, TD1-3, TD1-4, TD1-5, TD1-6, TD1-7, TD3-1, TD3-2, TD3-3, TD3-4, TD3-5, TD3-6, RY7-1, RY7-2, RY7-3, RY7-4, RY7-5, RY7-6, RY7-7, TR18-1, TR18-2, TR18-3, TR18-4, TR18-5

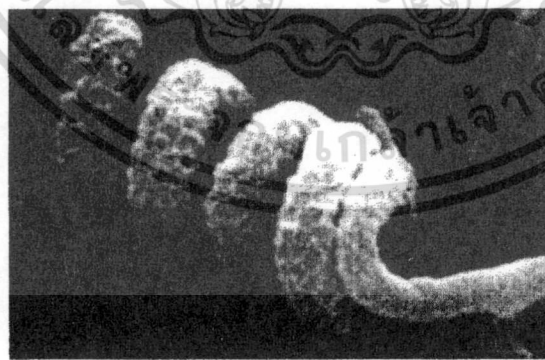
เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ รวมทั้งย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ และเชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis*, *M.luteus* และ *S.aureus* ได้



(ก)



(ข)



(ค)

### รูปที่ 3 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต TD1-1

ก) เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

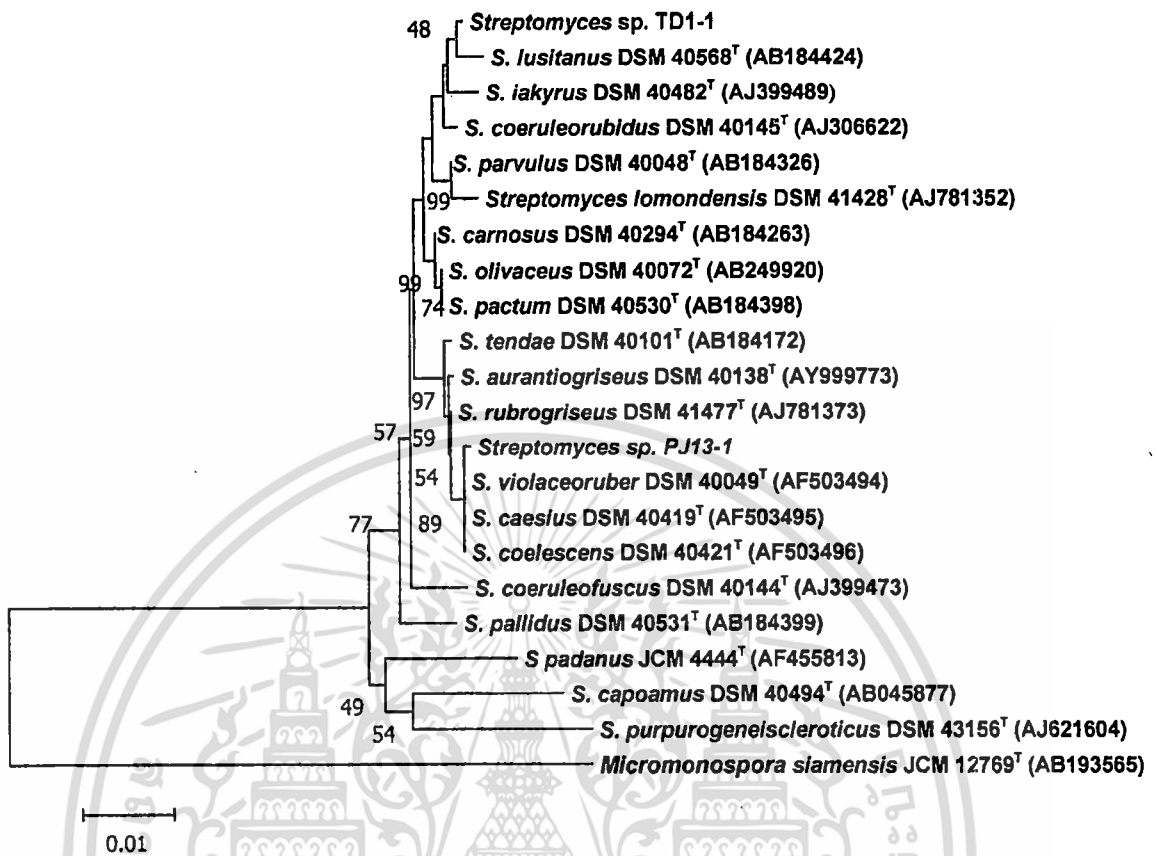
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิ ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส อะราบีโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาล ทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ได ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.1-71.6 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ ในสกุล *Streptomyces*

## การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TD1-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TD1-1 มีความ คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces lusitanus* DSM 40568<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.6 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 48 (รูปที่ 4)

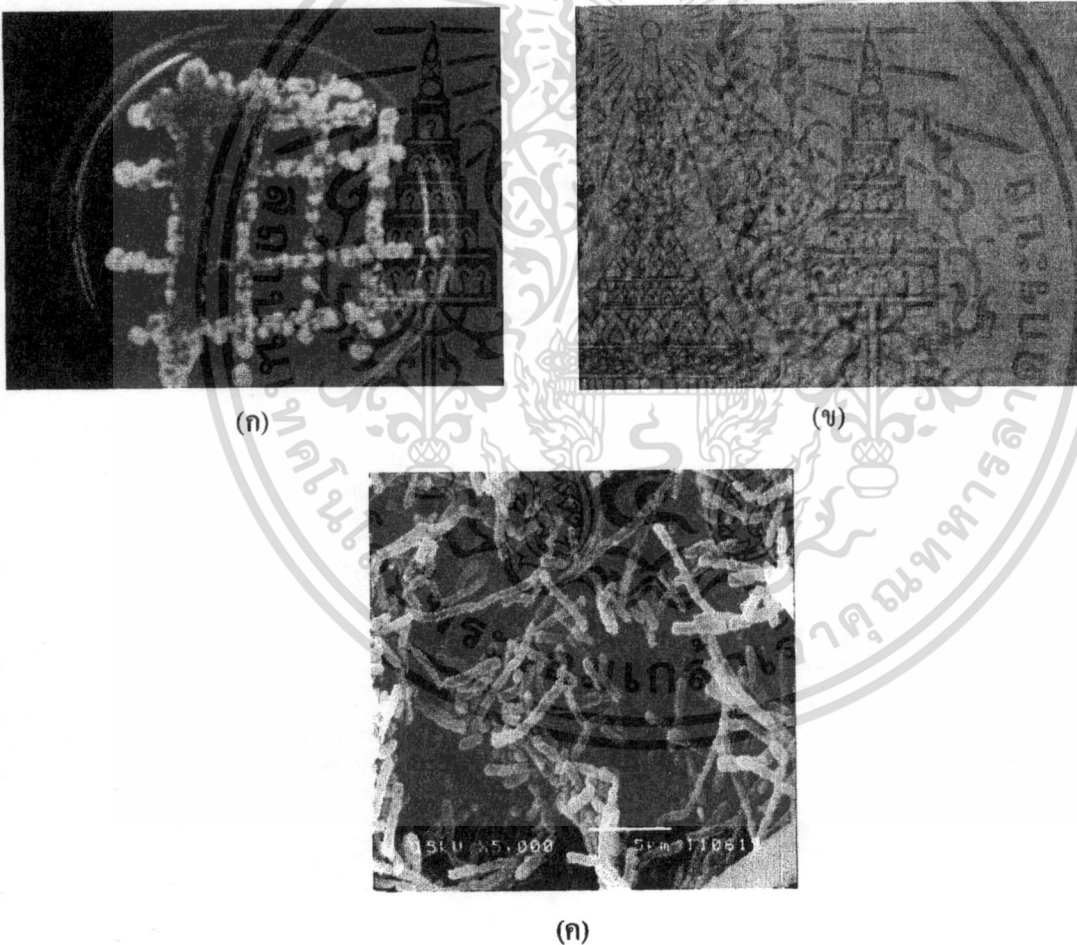


รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อ ไอ โซเลต TD1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีส้ม มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองส้มและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบตรง มีสมาชิกจำนวน 20 ไอโซเลต ได้แก่ TD2-1, TD2-2, TD2-3, TD2-4, TD2-5, RY4-1, RY4-2, RY4-3, RY4-4, RY4-5, SR16-1, SR16-2, SR16-3, SR16-4, SR16-5, TR19-1, TR19-2, TR19-3, TR19-4, TR19-5

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 7-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส แสดงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนม แป้ง รวมทั้งเจลาติน แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และเชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* และ *M.luteus*



รูปที่ 5 เชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต TD2-1

ก) เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

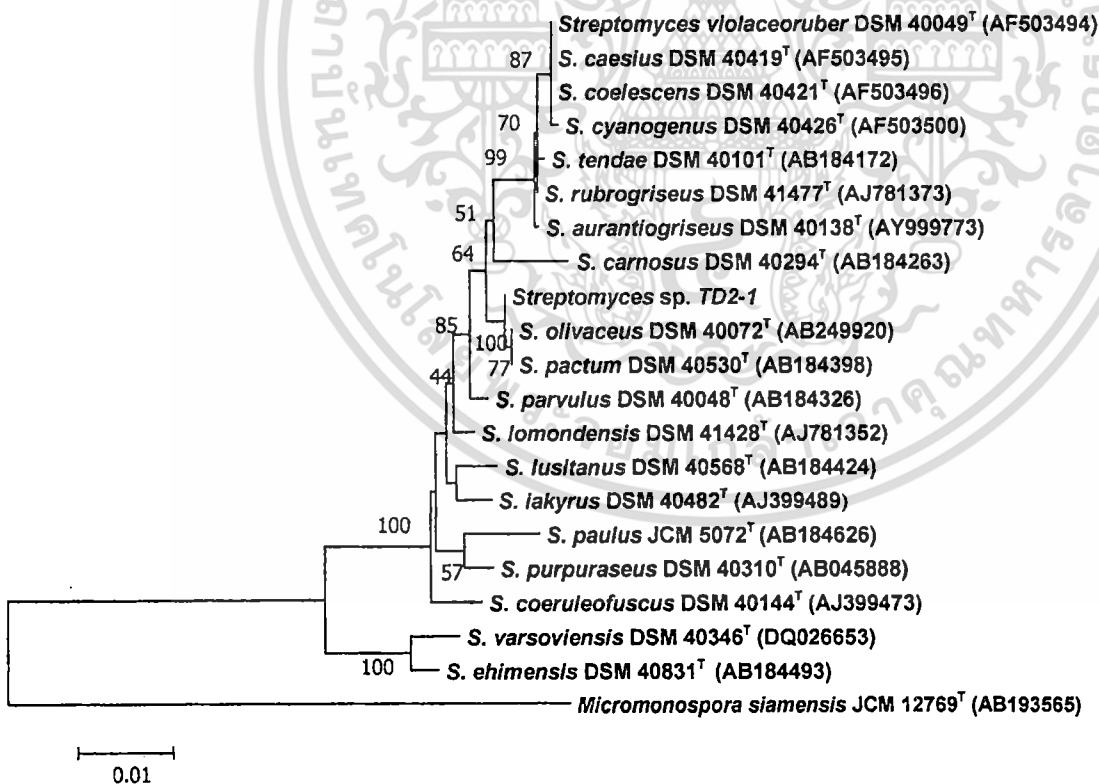
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมี ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส อะราบีโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาล ทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไค ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ ในสกุล *Streptomyces*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TD2-1

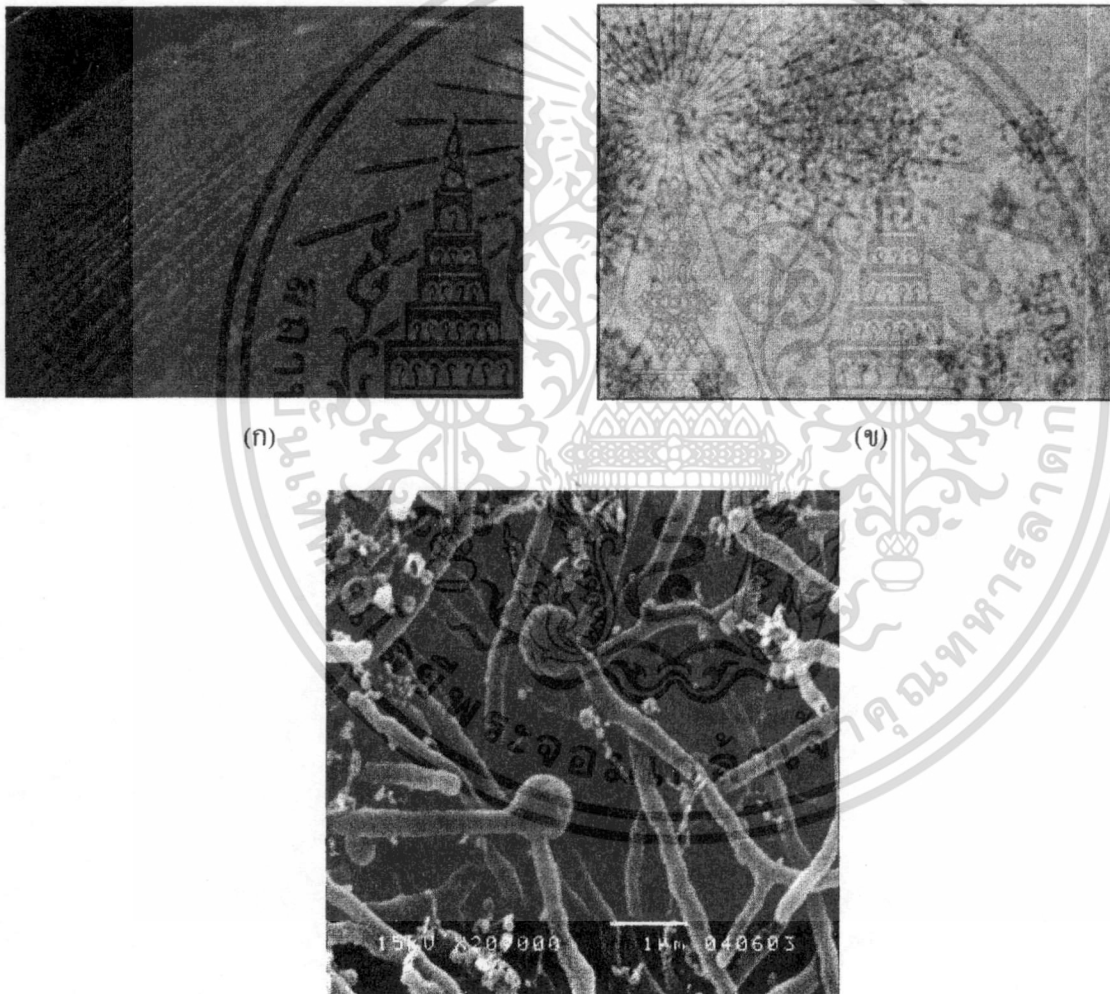
การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TD2-1 มีความ คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces olivaceus* DSM 40072<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต TD2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้ม ไม่พบเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุสีเหลือง สปอร์มีลักษณะกลม เต็มวออยู่บนเส้นใยอาหาร โดยตรง มีสมาชิกจำนวน 24 ไอโซเลต ได้แก่ RY6-1, RY6-2, RY6-3, RY6-4, RY6-5, RY8-1, RY8-2, RY8-3, RY8-4, RY8-5, PJ10-1, PJ10-2, PJ10-3, PJ10-4, PJ10-5, SR17-1, SR17-2, SR17-3, SR17-4, TR20-1, TR20-2, TR20-3, TR20-4, TR20-5 สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม ย่อยสลายแป้งและเจลาติน รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *M. luteus* ได้



(ก)

(ข)

(ค)

### รูปที่ 7 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต RY6-1

ก) เส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

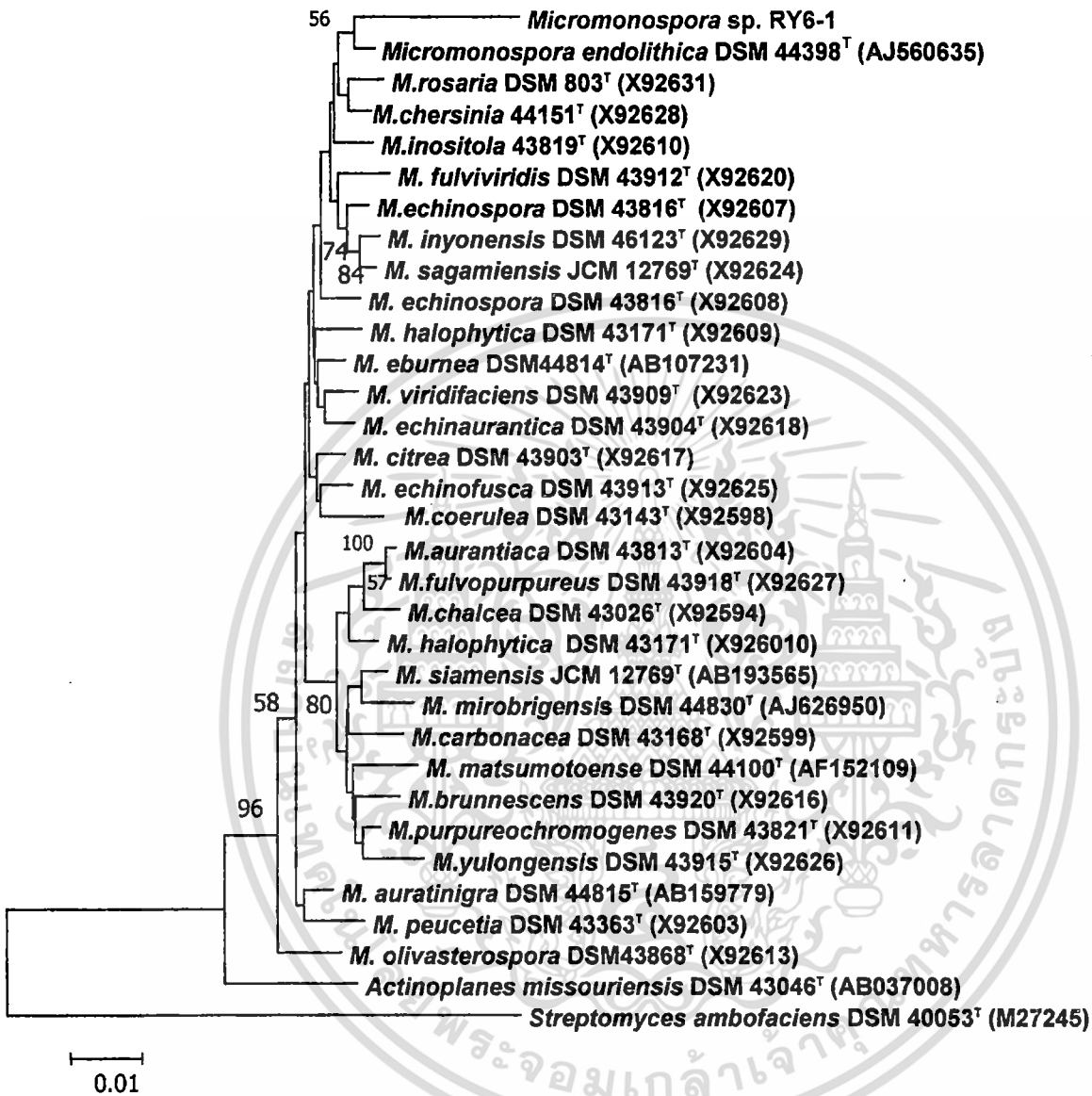
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพิมิติกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1Y) พบน้ำตาลกลูโคส ไฮโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.8-72.4 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต RY6-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต RY6-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora endolithica* DSM 44398<sup>T</sup> (AJ560635) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 56 (รูปที่ 8)

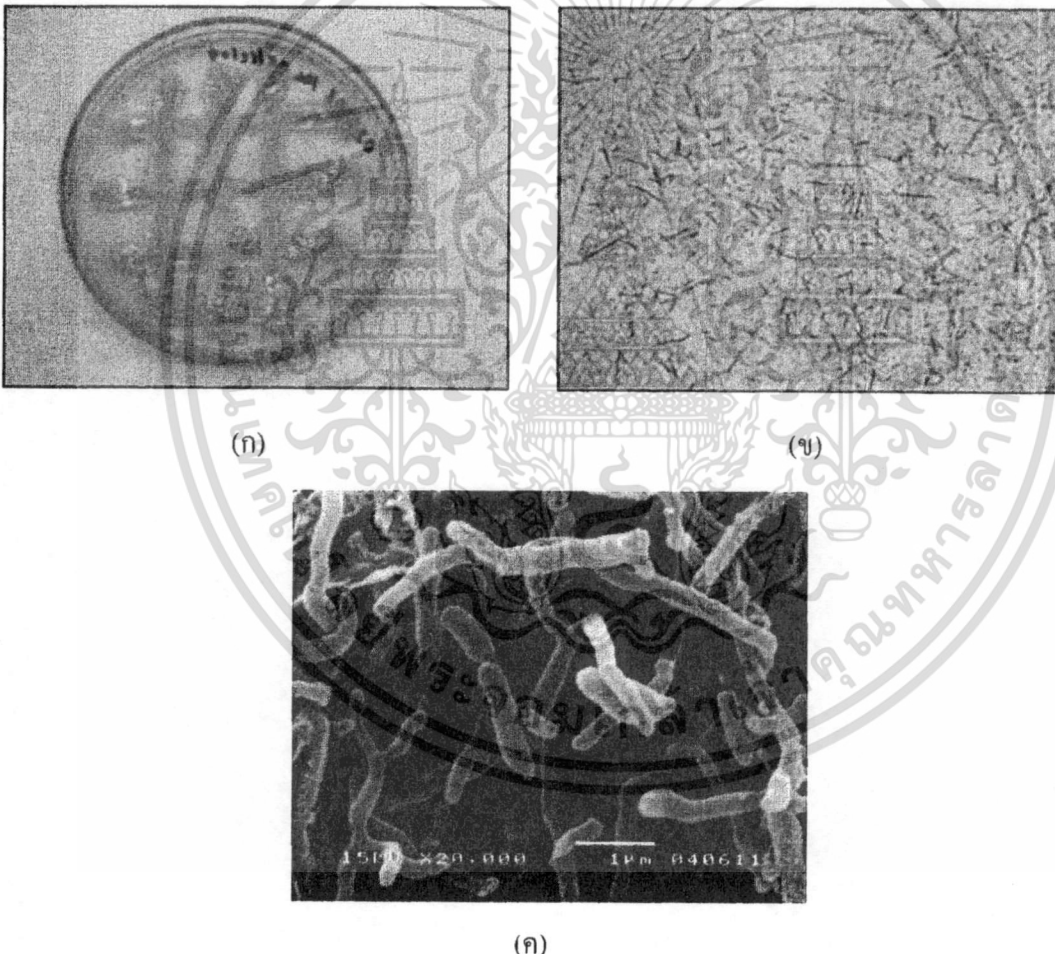


รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RY6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เจริญได้ดี yeast extract-malt extract agar (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์สายสั้นลักษณะตรง มีสมาชิก 5 ไอโซเลต ได้แก่ PJ13-1, PJ13-2, PJ13-3 SR15-3, SR15-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-8 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม ย่อยสลายแป้ง แต่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้



รูปที่ 9 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PJ13-1

ก) เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

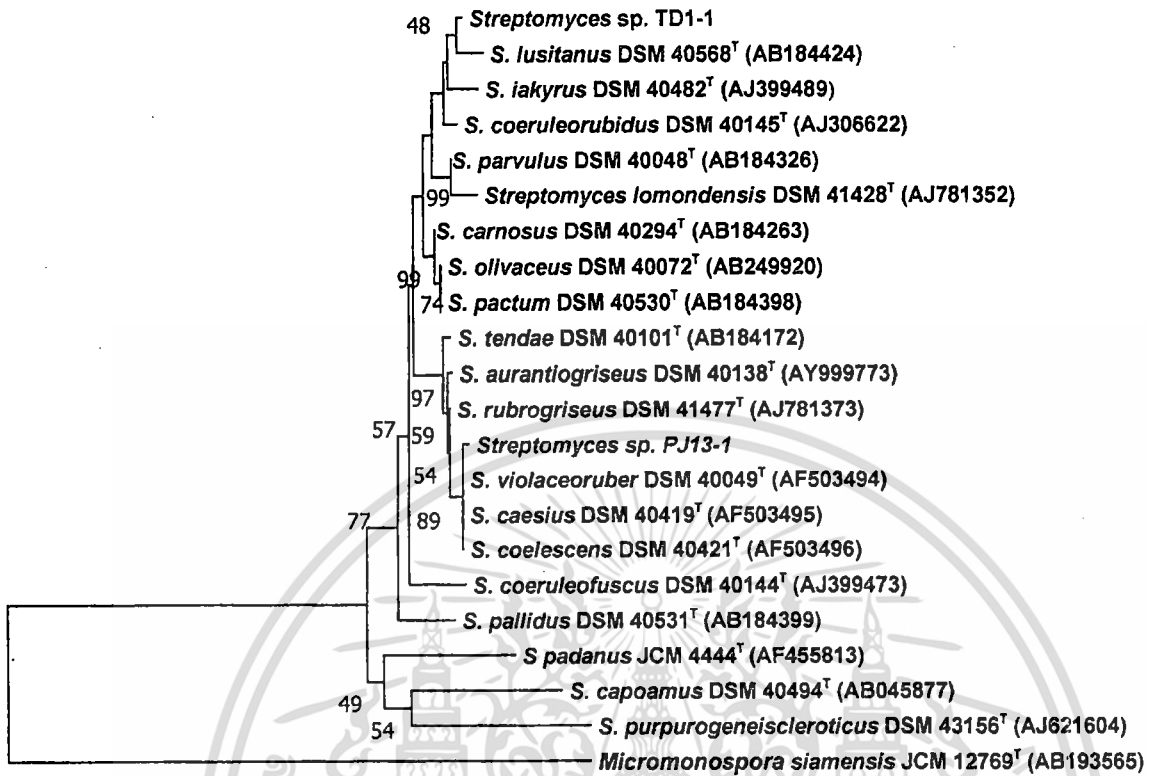
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิ ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส แมนโนส อะราบิโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลกลี เซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol manoside) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.2-71.8 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อ กลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PJ13-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PJ13-1 มีความ คล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces caesi* DSM 40419<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 89 (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PJ13-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/TR5-1	Y.M.	ดี	ม่วงอมเทา	เหลืองอ่อน	เหลือง
	O.M.	ดี	ม่วงอมเทา	เหลืองอ่อน	เหลือง
	I.S.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	ขาวอมเทา	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเทา	ขาวอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	ขาวอมเทา	ขาวอมเทา	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมเทา	ขาวอมเทา	-
	Cz.sucrose	ดี	ม่วงอมเทา	เหลืองอ่อน	เหลือง
	N.A.	ปานกลาง	ม่วงอมเทา	เหลืองอ่อน	เหลือง
P.I.A.	ดีมาก	ม่วงอมเทา	ม่วงอมเทา	เหลืองอ่อน	เหลือง
II/TD1-1	Y.M.	ดี	เทา	น้ำตาล	เหลือง อ่อน
	O.M.	ดี	เทา	น้ำตาล	เหลือง อ่อน
	I.S.	ปานกลาง	เทา	น้ำตาล	เหลือง อ่อน
	T.A.	น้อย	เทา	ส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	เทา	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	เทา	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	เทา	ส้มจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	เทา	น้ำตาล	เหลือง อ่อน
P.I.A.	ดี	เทา	น้ำตาล	เหลือง อ่อน	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
III/TD2-1	Y.M.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
	O.M.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
	I.S.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
	T.A.	น้อย	ขาว	น้ำตาล	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	น้ำตาล	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
	N.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลส้ม	เหลืองส้ม
IV/RV6-1	Y.M.	ดี	-	ส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	-	ส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้มเข้ม	-
	T.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Gly.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	-	ส้มเข้ม	-
	Cz.sucrose	ดี	-	ส้มเข้ม	-
	N.A.	ปานกลาง	-	ส้มจาง	-
	P.I.A.	ดี	-	ส้มเข้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
V/PJ13-1	Y.M.	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	TR5-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	10	16	10	13	10
	TR5-2	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	16	12	12	11	12	9
	TR5-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	16	10	13	12	13	9
	TR5-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	15	11	14	12	13	9
	PJ9-1	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	17	12	14	11	12	9
	PJ9-2	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	w	+	-	-	-	+	-	w	+	-	17	12	16	12	12	9
	PJ9-3	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	11	13	12	12	8
	PJ9-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	17	11	14	11	14	9
	PJ9-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	18	10	14	12	12	9
	PJ9-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	16	12	11	7
	PJ9-7	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	10	14	10	12	9
	PJ11-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	16	12	14	12	12	9
	PJ11-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	14	9	14	12	11	8

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
I	PJ11-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	15	11	14	12	13	9
	PJ11-4	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	14	11	12	9
	PJ12-1	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	16	12	12	9
	PJ12-2	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	17	11	13	12	12	8
	PJ12-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	17	11	14	11	14	9
	PJ12-4	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	w	+	-	-	-	+	-	w	+	-	18	10	14	12	12	9
	PJ12-5	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	16	12	11	7
	SR14-1	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	w	+	-	15	11	14	12	13	9
	SR14-2	+	+	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	10	14	10	12	9
	SR14-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	16	12	14	12	12	9
	SR14-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	14	9	14	12	11	8
	SR15-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	14	12	12	9
	SR15-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	17	12	14	12	12	9

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซิสในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
2	TD1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	19	12	22	-	-	-
	TD1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	+	+	+	+	+	17	16	20	-	-	-
	TD1-3	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	16	12	18	-	-	-
	TD1-4	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	w	+	+	17	14	19	-	-	-
	TD1-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	w	+	+	20	11	16	-	-	-
	TD1-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	w	+	+	-	-	+	+	w	+	+	18	14	17	-	-	-
	TD1-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	12	16	-	-	-
	TD3-1	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	w	+	+	15	11	19	-	-	-
	TD3-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	+	+	+	+	+	20	10	18	-	-	-
	TD3-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	16	12	19	-	-	-
	TD3-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	14	13	17	-	-	-
	TD3-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	20	12	16	-	-	-
	TD3-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	12	13	-	-	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
2	RY7-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	12	16	-	-	-
	RY7-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	15	11	19	-	-	-
	RY7-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	20	10	18	-	-	-
	RY7-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	w	+	+	16	12	19	-	-	-
	RY7-5	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	+	+	w	+	+	14	13	17	-	-	-
	RY7-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	w	+	+	-	-	+	+	w	+	+	20	12	16	-	-	-
	RY7-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	12	13	-	-	-
	TR18-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	-	+	+	w	+	+	15	11	14	-	-	-
	TR18-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	10	14	-	-	-
	TR18-3	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	16	12	14	-	-	-
	TR18-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	14	9	14	-	-	-
	TR18-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	17	12	14	-	-	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	7	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
		3	TD2-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-				+	+	+	-	+	21
	TD2-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	20	24	-	-	-	-
	TD2-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	20	20	-	-	-	-
	TD2-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	22	20	-	-	-	-
	TD2-5	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	23	23	-	-	-	-
	RY4-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	-	+	20	26	-	-	-	-
	RY4-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	17	27	-	-	-	-
	RY4-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	19	21	-	-	-	-
	RY4-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	17	20	-	-	-	-
	RY4-5	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	18	22	-	-	-	-
	SR16-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	19	25	-	-	-	-
	SR16-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	17	23	-	-	-	-
	SR16-3	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	20	24	-	-	-	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	7	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
3	SR16-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	20	20	-	-	-	-
	SR16-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	22	20	-	-	-	-
	TR19-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	23	23	-	-	-	-
	TR19-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	20	26	-	-	-	-
	TR19-3	+	+	w	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	17	27	-	-	-	-
	TR19-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	-	+	19	21	-	-	-	-
	TR19-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	-	+	17	20	-	-	-	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B.subtilis</i>	<i>M.Intens</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
4	RY6-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	19	-	-	-	-	
	RY6-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	16	-	-	-	-	
	RY6-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	20	-	-	-	-	
	RY6-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	17	-	-	-	-	
	RY6-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	20	-	-	-	-	
	RY8-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	18	-	-	-	-	
	RY8-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	18	-	-	-	-	
	RY8-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	16	-	-	-	-	
	RY8-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	14	-	-	-	-	
	RY8-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	17	-	-	-	-	
	PJ10-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	19	-	-	-	-	
	PJ10-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	18	-	-	-	-	
PJ10-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	21	-	-	-	-		

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
4	PJ10-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	21	-	-	-	-
	PJ10-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	18	-	-	-	-
	SR17-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	20	-	-	-	-
	SR17-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	21	-	-	-	-
	SR17-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	18	-	-	-	-
	SR17-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	17	-	-	-	-
	TR20-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	19	-	-	-	-
	TR20-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	18	-	-	-	-
	TR20-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	20	-	-	-	-
	TR20-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	18	-	-	-	-
TR20-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	19	-	-	-	-	



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตจากตัวอย่างดินและตะกอนดินใต้ทะเลบริเวณจังหวัดตราด ตรง ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ และสุราษฎร์ธานี สามารถทำการแยกเชื้อแอสโคไมซีตได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอสโคไมซีตที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร yeast extract malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโหนดีเทา ขาว และเหลือง สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโหนดีส้ม เหลือง และน้ำตาล ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็นส่วนใหญ่ บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอสโคไมซีตออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสีม่วงอมเทา เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน สร้างรงควัตถุสีเหลืองและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces yateensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.2

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาล สร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อนและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces lusitanus* DSM 40568<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.6

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีส้ม มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองส้มและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบตรง มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces olivaceus* DSM 40072<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้ม ไม่พบเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุสีเหลือง สปอร์มีลักษณะกลม เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora endolithica* DSM 44398<sup>T</sup> (AJ560635) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่เจริญได้ดี yeast extract-malt extract agar (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้าง

สปอร์สายสั้นลักษณะตรงมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces caesi* DSM 40419<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.8

ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากเชื้อแอกติโนมัยสีย พบว่ามี 95 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 95 ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่มีเชื้อแอกติโนมัยสียกลุ่มที่ 1 จำนวน 26 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 26 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก

จากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นความสำคัญของเชื้อแอกติโนมัยสียทางทะเลซึ่งเป็นทรัพยากรที่สำคัญและสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาปฏิชีวนะได้ต่อไปในอนาคต

#### ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสียที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์

## เอกสารอ้างอิง

### 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 Chimenó, R.I. 2004'-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 Activities. *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.
- Chimenó, 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., Kajjura, 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.
- David, J. N., and Gordon, M. C. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* 67: 1216-1238.
- 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.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 224-229.
- 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.
- Greenwood, R. C. and Gentry, D. R. 2002. Confirmation of the Antibacterial Mode of Action of SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from *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.
- 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, Y., 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.
- Kasai, H., Tamura, T. and Harayama, S. 2000. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gryB*- based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 127-134.
- 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, S., Suzuki, H., Morohoshi, T. and Hayashi, M. 1992. Mycinamicins, new macrolide antibiotics XIII. Isolation and structures of novel fermentation products from *Micromonospora griseorubida* (FERM BP-705). *J. Antibiotics*. 45: 1-9.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*. 19: 161-207.
- Kowamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora* In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria, IV. pp.2442-2450. The Williams and Wilkins, Baltimore.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- 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 Dithiopyrrolone 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 new inhibitor of Ca<sup>2+</sup> 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.

- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K.I. and Kudo, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1761-1767.
- 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.
- 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.
- Oki, T. 1994. S4-8 Recent Progress of Antibiotics Research *In Application Control of Microorganisms in Asia.* edited by. Komagata *et al.*, Japan : International Science and Technology Exchange Center., pp. 258-294.
- 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.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebe, R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-34.
- 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.
- Shirling, 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.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd. pp. 463-470.

- 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*. 5<sup>th</sup>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 Probe Technique*, pp.185-201. Edited by L.J. Kricka. New York: Academic Press.
- 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.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties *In Method in Microbiology*, 4<sup>th</sup> edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4<sup>th</sup> edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- 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., Shibasaki, M., Sasaki, I., 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.