

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

กิจกรรมการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน อนุกรมวิธาน และการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกจากดินในป่าผลัดใบของประเทศไทย

Anti-methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (Anti-MRSA) activity, taxonomy and preliminary determination of chemical constituents of actinomycetes isolated from Thai deciduous forest soils

โดย

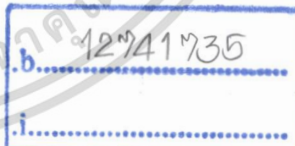
ผศ.ดร. จิตติ ท้าไว

คณะวิทยาศาสตร์

รชช

ร.419ก

๒๕๕๕



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สาขา.....

เลขทะเบียน 140541

รับเดือนปี - 9 ก.พ. 2559

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท้าว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

กิจกรรมการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิทิน  
อนุกรมวิธาน และการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อ  
แอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินในป่าผลัดใบของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ)

Anti-methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (Anti-MRSA)  
activity, taxonomy and preliminary determination of chemical  
constituents of actinomycetes isolated from Thai deciduous forest  
soils

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณ  
แผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2555

จำนวนเงิน 300,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555

ผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร. จิตติ ทำไผ่  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์

02-3298400 ต่อ 235

## บทคัดย่อ

เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 101 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์  
ประเทศไทย เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้  
เป็น 6 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพี  
โนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล  
*Streptomyces Micromonospora Nocardia* และ *Dactylosporangium* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต  
MW4-36 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Dactylosporangium* แต่  
มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล  
*Dactylosporangium* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต MW4-36 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล  
*Dactylosporangium* โดยให้ชื่อว่า *Dactylosporangium siamense* นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทน  
ในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อ  
จำนวนมากกว่าร้อยละ 83.9 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี น้ำหมักเชื้อของเชื้อตัวแทนไอ  
โซเลต KP8-ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้สารบริสุทธิ์ซึ่งพิสูจน์  
เอกลักษณ์ได้เป็นสาร เจลดานามัยซิน (geldanamycin) จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า  
เชื้อแอกติโนมัยซีทจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทยจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญใน  
การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากเชื้อแอกติโนมัยซีทต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

## Abstract

One hundred and one actinomycete strains were isolated from soil samples of Maewong National Park, Thailand. These strains were grouped using phenotypic chemotypic and genotypic characteristics into 6 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* and *Dactylosporangium*. Here, we found the strains MW4-36 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genera *Dactylosporangium* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Dactylosporangium* species. Therefore, the strain MW4-36 were judged to represent the novel species of the genus *Dactylosporangium* for which the name *Dactylosporangium siamense* was proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 83.9% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate KP8-1 yielded the known compound, geldanamycin. Based on these results, it could be concluded that actinomycete found in Maewong National Park is very great and should be represented an excellent source for the discovery of bioactive compound.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	10
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	51

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP2-1 บนอาหาร ISP2	16
2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP7-1 บนอาหาร ISP2	18
3 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KP2-1 และ KP7-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	19
4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW4-1บนอาหาร ISP2	20
5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP1-1 บนอาหาร ISP2	21
6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW4-1 และ KP1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	23
7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP8-1 บนอาหาร ISP2	24
8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KP8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	25
9 แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต MW4-36 บนอาหาร ISP2	26
10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW4-36 บน phylogenetic tree (NJ method)	28
11 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. KP8-1	44
12 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. KP8-1	45
25 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร KP8-A	46

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีท	7
2 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท	8
3 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้	15
4 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	29
5 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	32
6 การเปรียบเทียบข้อมูลของ $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ -NMR ระหว่างสาร KP8-A และ สารเจลดานามัยซิน	47



## 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

ISP = International *Streptomyces* Project

*M. luteus* = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

*Ps. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

$\mu\text{L}$  = microlitre



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

เชื้อจุลินทรีย์คือยาเป็นปัญหาต่อระบบสาธารณสุขปัจจุบันเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้มีการพัฒนาขบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์จนสามารถต้านยาที่ใช้กันอยู่ได้มากขึ้น ทำให้เป็นการยากต่อการรักษาและเป็นจุดเสี่ยงต่อชีวิตของผู้ป่วยมากขึ้น โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเรื้อรังและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คือยาเมทิลซิทิน (MRSA) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาแก่วงการสาธารณสุขและมีการระบาดตามโรงพยาบาลทั่วโลก เนื่องจากเชื้อชนิดนี้พัฒนาขบวนการเมตาบอลิซึมจนสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเบต้า-แลคแทมและกลุ่มไกลโคเปปไทด์ เป็นต้น (Yoo, 2007) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากจึงหันมาทำการแสวงหาวัตถุดิบหรือทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพในการผลิตยาต้นแบบชนิดใหม่เพื่อรองรับการระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์คือยาเหล่านี้ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Bérdy, 2005) ยาปฏิชีวนะหลายตัวที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น Amphotericin B, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่มีความจำเป็นอย่างมากในการเพิ่มโอกาสถึงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบตัวใหม่เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์คือยาในอนาคต ดังนั้นการศึกษาวิจัยหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่จึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรในประเทศไทย

โดยทั่วไปเชื้อแอคติโนมัยซีทมักกระจายตัวอยู่ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทในระบบนิเวศนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ ดินที่มาจากสถานที่ที่มีสภาพธรรมชาติที่สมบูรณ์มักมีอุบัติการณ์ในการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หลากหลาย ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยคัดเลือกรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีท จากดินในบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท ฤทธิ์ทางชีวภาพ และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อแยกได้นั้น การศึกษาวิจัยนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท ช่วยเพิ่มขีดความสามารถ ทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

### 1.2 วัตถุประสงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีทจากดินบริเวณป่าผลัดใบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ตลอดจนคัดเลือกรหัสแอกติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน (MRSA) และเชื้อทดสอบชนิดอื่น
- 1.2.2 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้
- 1.2.3 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก
- 1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน (MRSA) และเชื้อทดสอบชนิดอื่นๆ ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากดินบริเวณป่าผลัดใบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ เมื่อแยกเชื้อได้ (คาดว่าแยกเชื้อได้อย่างน้อย 100 ไอโซเลต) นำเชื้อเหล่านั้นมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ นำตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางจีโนไทป์ ทำให้สามารถยืนยันสกุลของเชื้อได้ หากพบเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์ใหม่จะนำเชื้อนั้นมาทำการศึกษาระดับสปีชีส์ ตลอดจนศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน (MRSA) และเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดอื่นๆ ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก ตลอดจนตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเบื้องต้นโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีและ  $^1\text{H-NMR}$

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

ปัจจุบันโรงพยาบาลต่างๆ ประสบปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาหลายประเภท เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน (MRSA) กลุ่มเชื้อเอนเทอโรโคคไคที่ดื้อยาแวนโคมัยซิน และการระบาดของเชื้อ *Acenitobacter calcoaceticus-baumannii complex* รวมถึงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมทิลซิวลิน (MRSA) นั้นปัจจุบันพบว่าสามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลายกลุ่ม เช่น กลุ่มเบต้า-แลคแตมและกลุ่มไกลโคเปปไทด์ เป็นต้น (Yoo, 2007; Francioli et al., 1991; Kim, 1995) จุลินทรีย์ดื้อยาเหล่านี้จึงเป็นโจทย์ที่ท้าทายต่อนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมากที่จะต้องเร่งแก้ปัญหาการระบาดในปัจจุบันและสืบเนื่องไปถึงอนาคต การแก้ปัญหาทางหนึ่งคือ การพยายามเร่งหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่มาทดแทนยาเดิมที่เคยใช้กันอยู่

สารปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนมากพัฒนามาจาก lead compound ที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท จากเหตุผลนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ซึ่งตรงกับแนวคิดที่ว่า “ใช้จุลินทรีย์แก้ปัญหามicrobial ด้วยตัวเอง” เชื้อแอคติโนมัยสีทมีหลายสกุลและสามารถค้นพบได้มากขึ้นเนื่องจากมีเทคนิคใหม่ในการแยกเชื้อที่จำเพาะยังผลให้การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีทเพิ่มสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น จากการศึกษาทางด้านการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงประชากรของเชื้อแอคติโนมัยสีทค่อนข้างสูง เนื่องจากได้ทำการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุลและสปีชีส์ใหม่หลายชนิด เช่น *Actinocatenispora thailandica* (Thawai et al., 2006), *Micromonospora eburnea* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora siamensis* (Thawai et al., 2005) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังมีการพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (Micromonosporin A) จากเชื้อ *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004) ด้วย ซึ่งในการรายงานการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดใหม่ในประเทศไทยถือว่าค่อนข้างน้อยเนื่องจากยังคงมีการทำการศึกษาวิจัยในวงจำกัด เมื่อทราบข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจดังนี้แล้วการศึกษาเพื่อค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงและหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อนั้นผลิตสาร lead compound ได้มากที่สุด ตลอดจนการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทนั้นจึงเป็นงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่งเพื่อเป็นการดึงเอาทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คือยามเทิลซิลิน (MRSA) ถูกค้นพบพร้อมๆ กับระยะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเมทิลซิลินเป็นครั้งแรกในทวีปยุโรป ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาเชื้อชนิดนี้ได้มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก (Francioli et al., 1991) เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อที่มักพบการระบาดอยู่ในโรงพยาบาลทั่วโลกในปัจจุบันและพบว่ามักติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจโดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโพรงจมูกและแผลเปิดขนาดใหญ่ (Kim, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากสัตว์และสิ่งแวดล้อมตามที่ที่มีการทำปศุสัตว์ด้วย ทั้งนี้อาจเกิดจากมีการใช้สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) เป็นสารเติมแต่งเพื่อกระตุ้นการเจริญในสัตว์กันอย่างฟุ่มเฟือยจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้เกิดขึ้น (Vanden Boogaard and Stobberingh, 1996) ในการควบคุมการติดเชื้อชนิดนี้ในปัจจุบันมักใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม polyether ionophore เช่น monensin laidlomycin และ salinomycin เป็นต้น (Wampler et al., 1998)

นอกจากนี้ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ๆ เพื่อมาทดแทนยาปฏิชีวนะตัวเดิมเพื่อป้องกันการการดื้อยาของเชื้อในอนาคตกทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ถูกค้นพบมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก เนื่องจากมีเทคนิคใหม่ในการแยกเชื้อที่จำเพาะยังผลให้การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น

จากการศึกษาทางด้านการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผ่านมานั้นทำให้ทราบถึงว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงประชากรของเชื้อแอคติโนมัยซีทค่อนข้างสูง เนื่องจากได้ทำการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลและสปีชีส์ใหม่หลายชนิด เช่น *Actinocatenispora thailandica* (Thawai et al., 2006), *Micromonospora eburnea* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora siamensis* (Thawai et al., 2005) เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (Micromonosporin A) จากเชื้อ *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004) ด้วย ซึ่งในการรายงานการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ในประเทศไทยถือว่าค่อนข้างน้อยเนื่องจากยังคงมีการทำการวิจัยในวงจำกัด เมื่อทราบข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจดังนี้แล้วการศึกษานุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นจึงเป็นงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่งเพื่อเป็นการดึงเอาทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทในต่างประเทศนั้น ได้มีรายงานการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งสกุลและสปีชีส์ใหม่อย่างต่อเนื่องซึ่งสามารถค้นคว้าได้จาก <http://ijs.sgmjournals.org/> ซึ่งเป็นเว็บไซต์ของวารสาร International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology ที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับอนุกรมวิธานของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยตรง

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในระดับสกุลและสปีชีส์ อาศัยลักษณะทางพีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่ 1) 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 ปัจจุบันมีการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หลากหลายสกุล (ตารางที่ 2) ดังนั้นการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิมและคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อและและวิทยาศาสตร์สาธารณสุขได้ต่อไป

ตารางที่ 1 ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีท

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

\* Novel sugar pattern comprising arabinose, galactose and xylose

ND, not determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

Compounds	Strains	Activity	References
Abyssomicins (1)	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacterial	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
Aureoverticillactam (2)	<i>Streptomyces</i> <i>aureoverticillatus</i>	Anticancer	Mitchell <i>et al.</i> , 2004
Cebulactams (3)	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	Antibacterial; Antioxidant	Pimentel-Elardo <i>et al.</i> , 2008
Caprolactones (4)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Stritzke <i>et al.</i> , 2004
Chandrananimycins (5)	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialagi; Antibacterial; anticancer; antifungal	Maskey <i>et al.</i> , 2003
Geldanamycin (6)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Suchada <i>et al.</i> , 2006
Proximicin (7)	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antiicancer	Philip <i>et al.</i> , 2008
Ikarugamycin (8)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial, antiprotozoal, Antiulcer	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Chloro- dihydroquinones (9)	<i>Novel actinomycete</i>	Antibacterial; Anticancer	Soria-Mercado <i>et al.</i> , 2005

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

Compound	Source	Activity	References
Diazepinomicin (ECO-4601) (10)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; Anticancer; Anti-inflammatory	Charan <i>et al.</i> , 2004
3,6-disubstitutedindoles (11)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Sanchez Lopez <i>et al.</i> , 2003
Frigocyclinone (12)	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Glaciapyrroles (13)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2005
Gutingimycin (14)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Helquinoline (15)	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial	Asolkar <i>et al.</i> , 2004
8-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione (16)	<i>Streptomyces acrimycini</i>	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Saliniketal (17)	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancerchemoprevention	Jensen <i>et al.</i> , 2006
Komodoquinone A (18)	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity	Itoh <i>et al.</i> , 2003
Lajollamycin (19)	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	Manam <i>et al.</i> , 2005
Marinomycins (20)	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; Anticancer	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmycins (21)	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
leucyl-4-hydroxyproline (22)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
SalinosporamideA (NPI-0052) (23)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling <i>et al.</i> , 2003
Sporolides (24)	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity	Buchanan <i>et al.</i> , 2005
Trioxacarcins (25)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; Anticancer; Antimalarial	Maskey <i>et al.</i> , 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 10 อย่าง คาดว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้อย่างน้อย 100 ไอโซเลต และจะทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อที่จะนำมาทำการศึกษาต่อไป

การเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita *et al.* (1986)

##### 3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท 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 คูลสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ในที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 21 วัน เลือกลูกโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

##### 3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเยือกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol

##### 3.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดียวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คือยาเมทิลซิวลิน (MRSA) *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

#### 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบโดยดูการเจริญ 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 การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษาจะสามารจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

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

นำเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มมาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 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 อปที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่เกิดกับ standard

##### 3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม polar lipid จากการสกัดเซลล์แห้งด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ที่ทำให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย 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) แล้วพ่นด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

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

#### 3.2.3.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract - Malt extract broth เป็นเวลา 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อและล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และโปรตีน ด้วยการเติม RNase solution และ proteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใน ethanol

#### 3.2.3.2 การวิเคราะห์

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

### 3.2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DBJ โดยใช้ BLAST n program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 4.02 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

### 3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

#### 3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

หยด 100  $\mu$ l ของสารละลาย heat – denatured DNA (1  $\mu$ g DNA / well) ของ type strain, control DNA (calf thymus หรือ *E. coli*) และ DNA ของเชื้อ unknown บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วเทสารละลาย DNA นั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปล่อยให้แห้งที่ 45-60 องศาเซลเซียส

### 3.2.5.2 DNA labeling with photobiotin ( DNA probe )

เตรียมสารละลาย DNA ของ type strain ในหลอด eppendrot เติมสารละลาย photobiotin ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอด sunlamp เติม 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0) และ n-butanol บั่นด้วย vortex บั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และบั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำ DNA ที่ติดฉลากแล้วไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วและนำไป sonicate แล้วนำไปผสมกับ hybridization solution

### 3.2.5.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

### 3.2.5.4 Hybridization

หยดสารละลายที่ผสม DNA probe ของ type strain ลงแต่ละหลุม ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งสารละลายนี้

### 3.2.5.5 Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X – 100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลาย I ทิ้ง

**Colorimetric method :** เติมสารละลาย streptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย tetramethyl benzidine – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

$$\text{การคำนวณ Homology \%} = (V_{\text{sample}} - V_{\text{control}} / V_{\text{type strain}} - V_{\text{control}}) \times 100$$

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

### 3.3 การหมักเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO<sub>3</sub>; pH 7.3) โดยเติม inoculum 1% ของเอกลำนี้เป็นเอกลำที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกลำทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอา ส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้ว นำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) สารสกัดหยาบที่ได้แต่ละส่วนนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและอีกส่วนนำไปตรวจสอบ ลักษณะทางเคมีเบื้องต้น

### 3.4 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิด นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย เทคนิคทาง spectroscopy เช่น  $^1\text{H-NMR}$

### 3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

#### 3.5.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้ การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไป ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียม งานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 13.1.4 นำเชื้อทดสอบผสมกับ น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่ หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20  $\mu\text{l}/\text{disc}$  ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของ อาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวม เส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญ ของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

## บทที่ 4

### ผลการดำเนินการวิจัย

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน ดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสืทหยาขากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสืททั้งหมด 101 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.52- 7.21 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสืทที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดิน	กำแพงเพชร	7.21	KP1	KP1-1, KP1-2, KP1-3, KP1-4, KP1-5, KP1-6, KP1-7, KP1-8, KP1-9
ซากใบไม้	กำแพงเพชร	6.77	KP2	KP2-1, KP2-2, KP2-3, KP2-4, KP2-5, KP2-6, KP2-7, KP2-8, KP2-9, KP2-10
ทราย	กำแพงเพชร	7.18	KP3	KP3-1, KP3-2, KP3-3, KP3-4, KP3-5, KP3-6, KP3-7, K3-8, KP3-9, KP3-10
ดิน	กำแพงเพชร	7.20	MW4	MW4-1, MW4-2, MW4-35, MW4-4, MW4-5, MW4-6, MW4-7, MW4-8, MW4-9, MW4-10
ซากใบไม้	กำแพงเพชร	6.64	MW5	MW5-1, MW5-2, MW5-3, MW5-4, MW5-5, MW5-6, MW5-7, MW5-8, MW5-9, MW5-10
ซากใบไม้	กำแพงเพชร	7.11	MW6	MW6-1, MW6-2, MW6-3, MW6-4, MW6-5, MW6-6, MW6-7, MW6-8, MW6-9, MW6-10, MW6-11, MW6-12
ดิน	กำแพงเพชร	6.67	KP7	KP7-1, KP7-2, KP7-3, KP7-4, KP7-5, KP7-6, KP7-7, KP7-8, KP7-9, KP7-10, KP7-11, KP7-12, KP7-13, KP7-14
ดิน	กำแพงเพชร	6.92	KP8	KP8-1, KP8-2, KP8-3, KP8-4, KP8-5, KP8-6, KP8-7, KP8-8, KP8-9, KP8-10
ซากใบไม้	กำแพงเพชร	7.06	KP9	KP9-1, KP9-2, KP9-3, KP9-4, KP9-5, KP9-6, KP9-7
ดิน	กำแพงเพชร	6.52	MW10	MW10-1, MW10-2, MW10-3, MW10-4, MW10-5, MW10-6, MW10-7, MW10-8, MW10-9

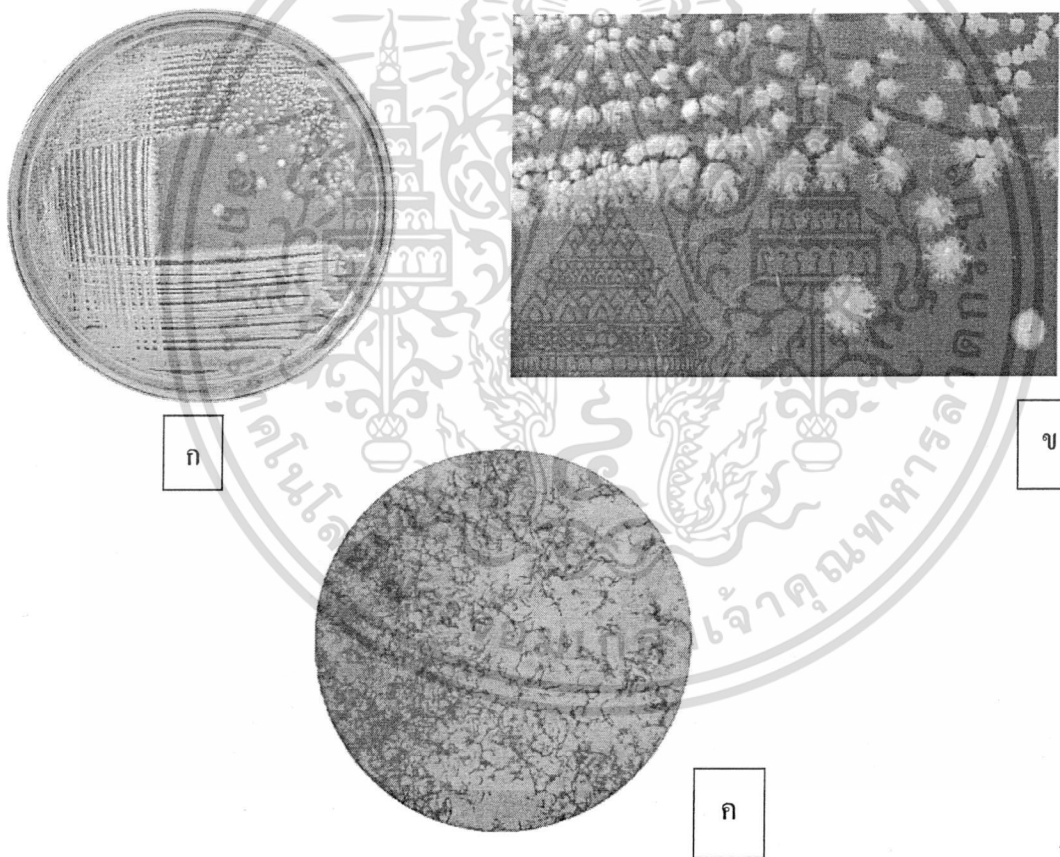
#### 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสืท

##### 4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสืททั้งหมด 101 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้ เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีส้ม (Moderate Orange) เส้นใยอาหารสีส้มไสอมแดง (Vivid Reddish Orange) เส้นใยสามารถแตกหักได้ง่าย มีลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยแบบซิกแซก และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Nocardia* เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 22 ไอโซเลต ได้แก่ KP2-1, KP2-2, KP2-3, KP2-4, KP2-5, KP2-6, KP2-7, KP2-8, KP2-9, KP2-10, MW6-1, MW6-2, MW6-3, MW6-4, MW6-5, MW6-6, MW6-7, MW6-8, MW6-9, MW6-10, MW6-11, MW6-12 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุคร้อยละ 4 ความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนมและรีติวซ์ในเครทได้ สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี-ฟรักโตส ดี-ไรโบสและ แอล-อะราบีโนส สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* และ *M.luteus* ได้



รูปที่ 1. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP2-1บนอาหาร ISP2  
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

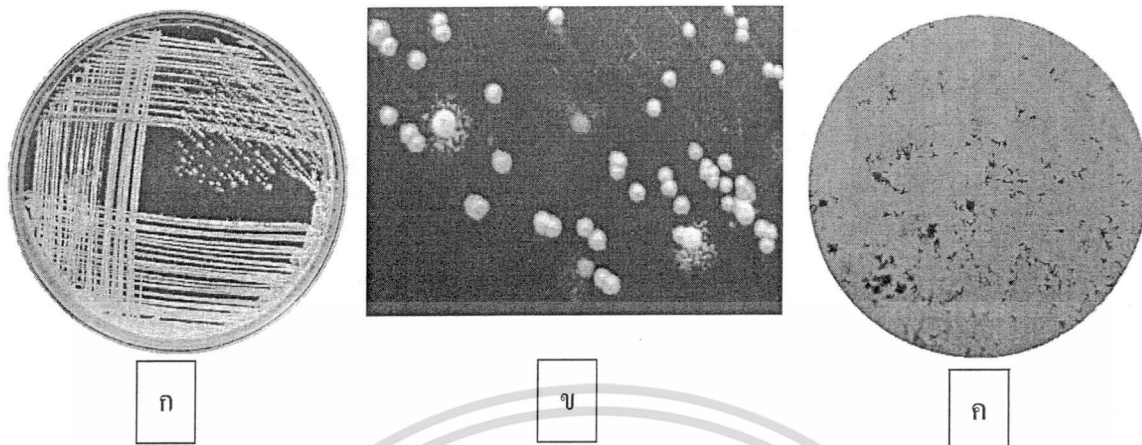
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไขมันโนพิมิลิกแบบ meso พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบกรดไมคอติก (mycolic acids) ในผนังเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Nocardia*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KP2-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต KP2-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Nocardia niigatensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 (รูปที่ 3)

กลุ่มที่ 2 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มนี้ เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลสว่างอมเทา (Light Grayish Brown) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown) และสร้างรงควัตถุสีเหลืองอมส้มเข้ม (Deep Orange Yellow) เส้นใยสามารถแตกหักได้ง่าย มีลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยแบบซิกแซก และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Nocardia* เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 24 ไอโซเลต ได้แก่ KP3-1, KP3-2, KP3-3, KP3-4, KP3-5, KP3-6, KP3-7, K3-8, KP3-9, KP3-10, KP7-1, KP7-2, KP7-3, KP7-4, KP7-5, KP7-6, KP7-7, KP7-8, KP7-9, KP7-10, KP7-11, KP7-12, KP7-13, KP7-14 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 6 ความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาตินและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี-ไรโบสและแอล-อะราบิโนส สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M.luteus* ได้



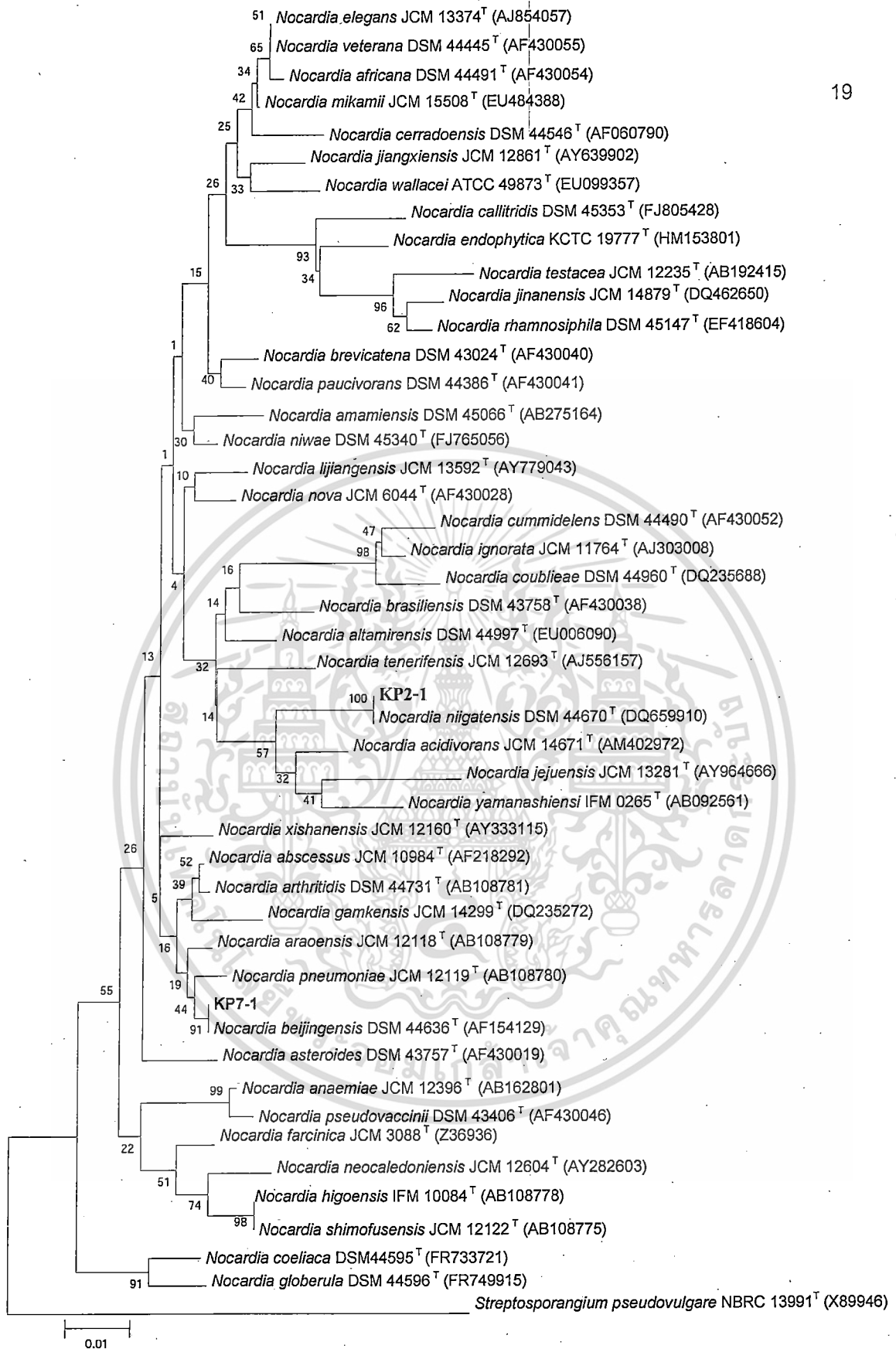
รูปที่ 2. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP7-1 บนอาหาร ISP2  
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส อะราบิโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบกรดไมคอติก (mycolic acids) ในผนังเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Nocardia*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KP7-1

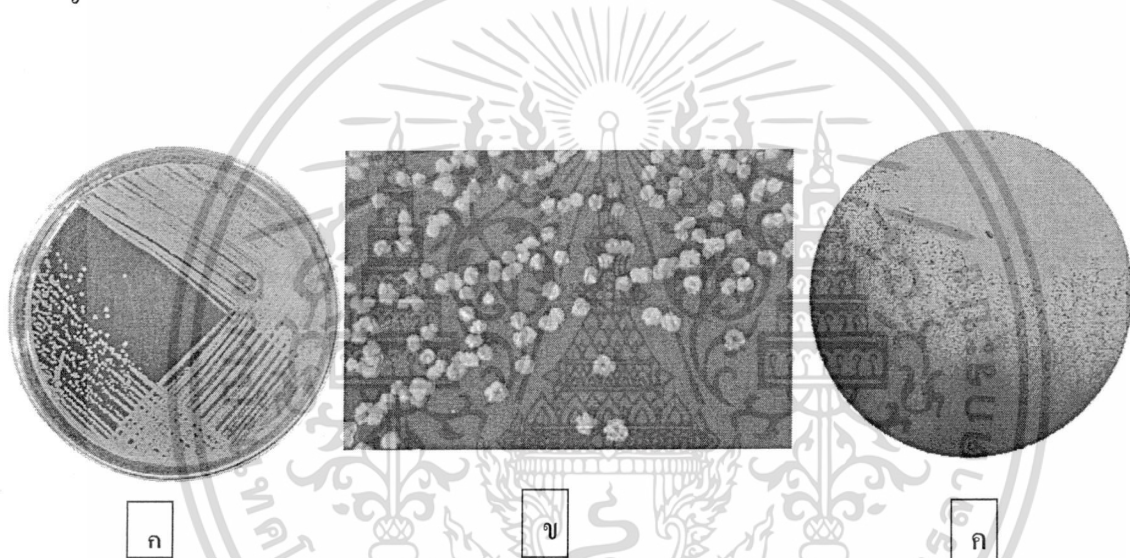
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต KP7-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Nocardia beijingensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 91 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KP2-1 และ KP7-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลส้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีน้ำตาลอ่อน สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 4) เจริญได้ดีบนอาหาร YM ประกอบด้วยเชื้อ 19 ไอโซเลตคือ MW4-1, MW4-2, MW4-4, MW4-5, MW4-6, MW4-7, MW4-8, MW4-9, MW4-10, MW5-1, MW5-2, MW5-3, MW5-4, MW5-5, MW5-6, MW5-7, MW5-8, MW5-9, MW5-10 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 ความเป็นกรด-ด่าง 6 ถึง 12 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เกล็ดินโปรตีนในนมแต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ได้ สามารถผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-กาแลคโตส ดี-ฟรุกโตส ดี-เมลลิบิโอส ดี-แรฟไฟโนส และดี-ไซโลสได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* และ *M.luteus* ได้



รูปที่ 4 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW4-1 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

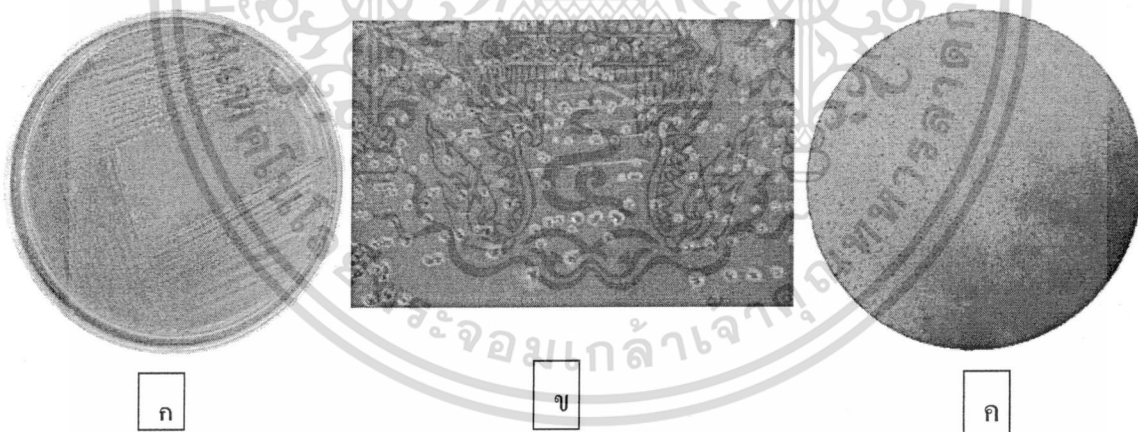
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนที่มีลักษณะแบบ meso (cell wall type II, peptidoglycan type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบ ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟดีทิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสโฟดีทิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต MW4-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต SH2-13 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora coxensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 88 (รูปที่ 6)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเหลือง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 5) เจริญได้ดีบนอาหาร YM ประกอบด้วยเชื้อ 16 ไอโซเลต คือ KP1-1, KP1-2, KP1-3, KP1-4, KP1-5, KP1-6, KP1-7, KP1-8, KP1-9, KP9-1, KP9-2, KP9-3, KP9-4, KP9-5, KP9-6, KP9-7 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 ความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในนมได้ สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-เมลิไบโอส ดี-เรฟิโนส แลคโตส ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส เซลโลไบโอส ดี-ฟรักโตส ดี-ไซโลส



รูปที่ 5. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KP1-1 บนอาหาร ISP2

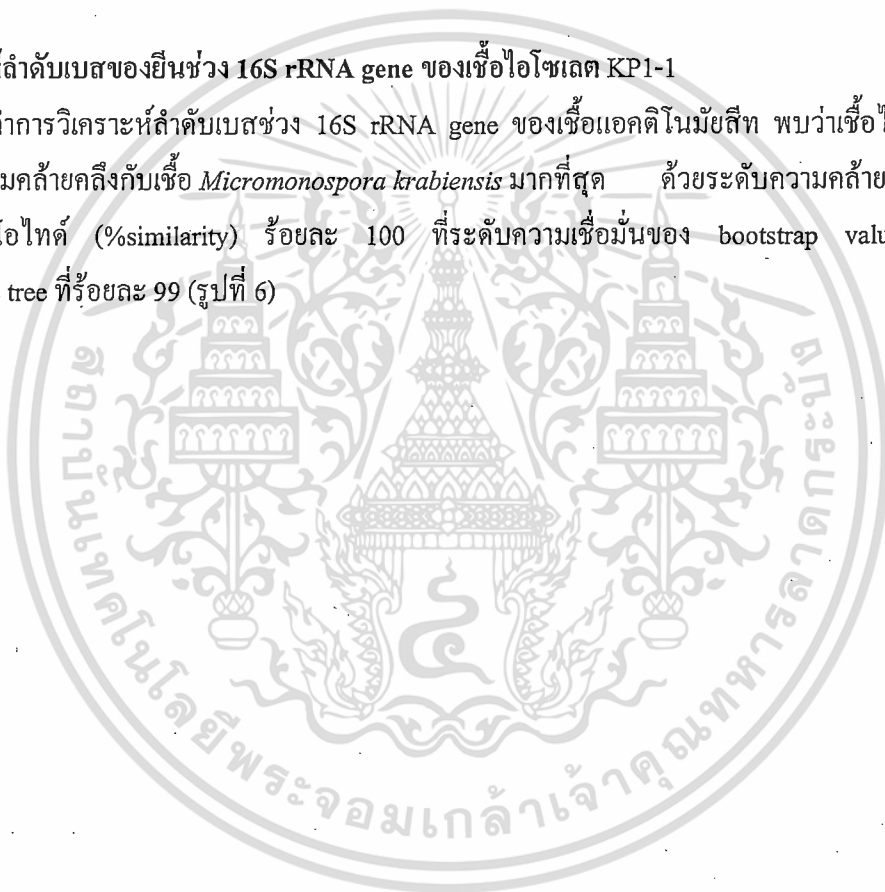
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบไข้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

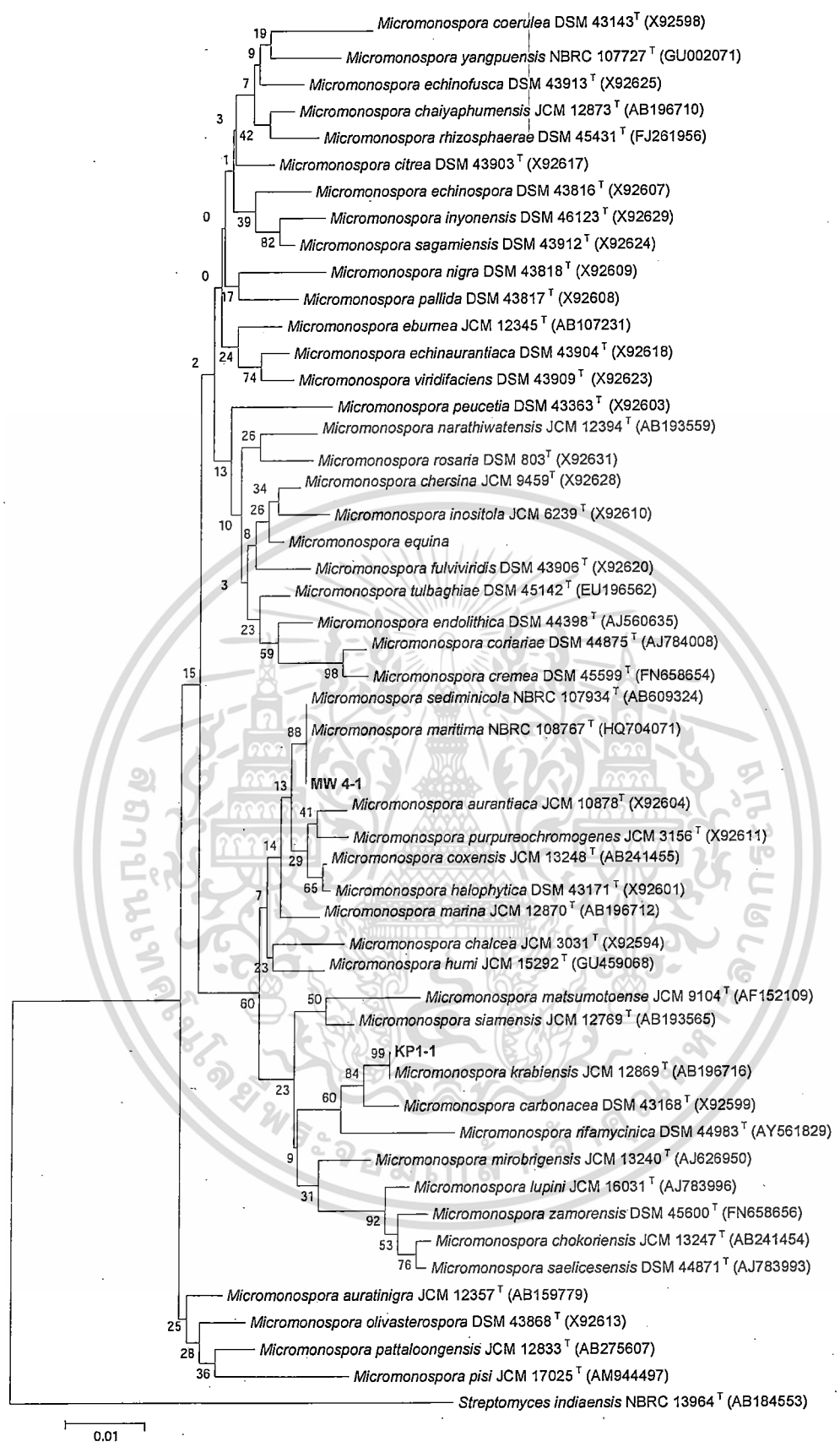
#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรด ไคอะมิโนพิมิสิกแบบ *meso* พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแลคโตส ไซโลส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไคฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KP1-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต KP1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora krabiensis* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 6)





รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW4-1 และ KP1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาและกลายเป็นสีดำเมื่อสร้างสปอร์ เส้นใยอาหารน้ำตาลอมเหลือง ไม่สร้างรงควัตถุ ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) (รูปที่ 9) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีสมาชิก 19 ไอโซเลต คือ KP8-1, KP8-2, KP8-3, KP8-4, KP8-5, KP8-6, KP8-7, KP8-8, KP8-9, KP8-10, MW10-1, MW10-2, MW10-3, MW10-4, MW10-5, MW10-6, MW10-7, MW10-8, MW10-9

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม แป้ง เกล็ดดิน และสามารถรีดิวซ์ในเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลดี-แมนนิทอล ดี-เมลิไบโอส แอล-แรมโนส ดี-ไรโบส ดี-กาแลคโตส ดี-ไซโลส กลีเซอรอล ดี-ฟรักโตส และสามารถผลิตสารพิษภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis*, *M.luteus*, *MRSA*, *E.coli* และ *C.albicans* ได้



รูปที่ 7. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต KP8-1 บนอาหาร ISP2  
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

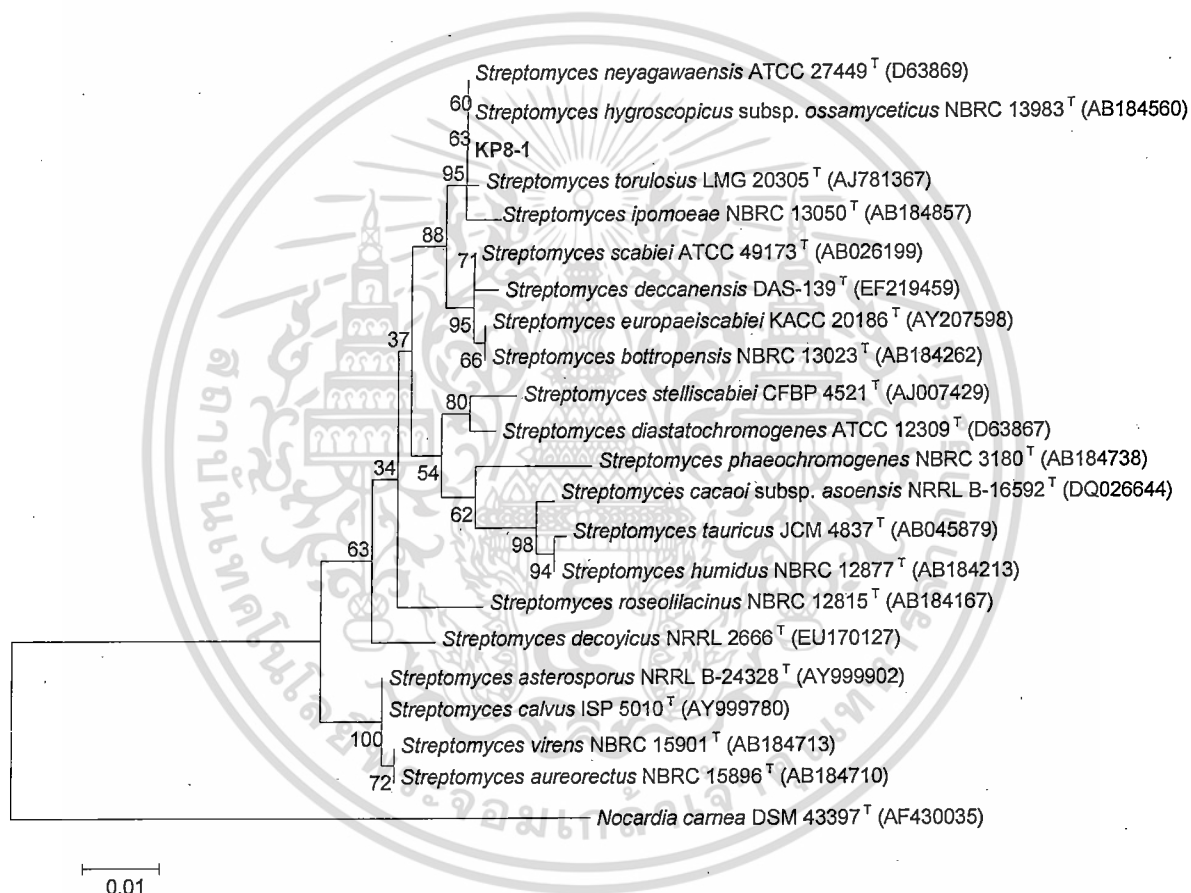
#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside), ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KP8-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TR6-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ossamyceticus* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 63 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KP8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 6 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ ที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์แรงเฉิมรูปร่างคล้ายกระบอง ภายในบรรจุด้วยสปอร์ลักษณะกลมรี (รูปที่ 13) ประกอบด้วยสมาชิก 1 ไอโซเลตคือ MW4-36

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 6-8 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดคือดี-แมนนิทอล ดี-แรมโนส แอล-ร่าฟิโนส และกลีเซอรอล แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซาลิซินได้



ก

รูปที่ 9 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW4-36 บนอาหาร ISP2  
 ข กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)  
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

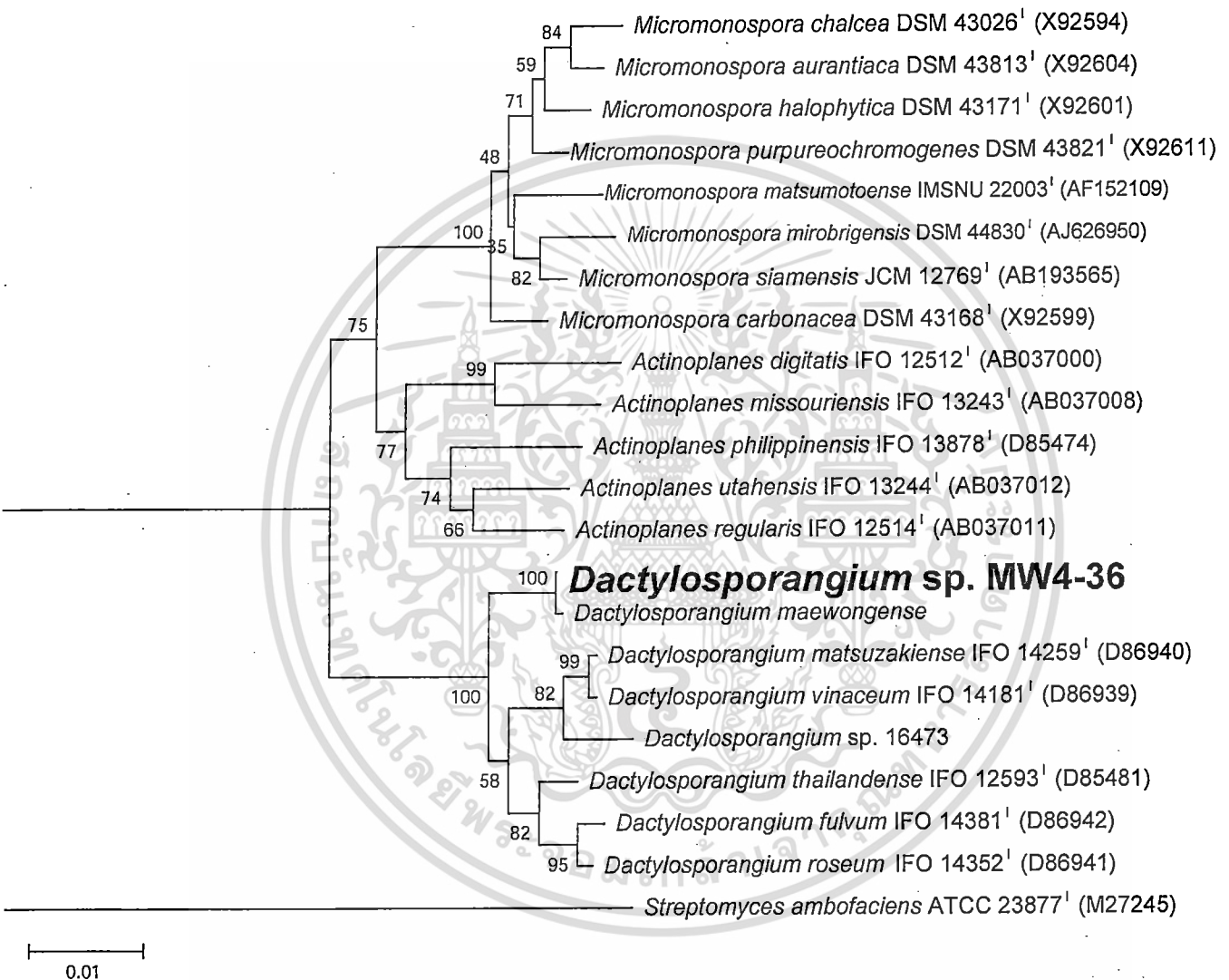
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 6

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แรมโนส อะราบิโนส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Dactylosporangium*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต MW4-36

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต MW4-36 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Dactylosporangium maewongense* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 (รูปที่ 10) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต MW4-36 และเชื้อ type strain ของสกุล *Dactylosporangium* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Dactylosporangium maewongense*) มีค่าเท่ากับ 43.2 % จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่า เชื้อไอโซเลต MW4-36 เป็นคนละสปีชีส์กับ *Dactylosporangium maewongense*



รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซแลต MW4-36 บน phylogenetic tree (NJ method)

ตารางที่ 4. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/KP2-1	Y.M.	ดี	ส้ม	ส้มอมแดง	-
	O.M.	ดี	ส้มอ่อน	ส้มอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ส้มอ่อน	ส้มอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	Gly.A.	น้อย	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	ส้ม	ส้ม	-
	P.I.A.	ดีมาก	ส้ม	ส้ม	-
II/KP7-1	Y.M.	ดี	น้ำตาล	น้ำตาล	เหลืองอมส้ม
	O.M.	ดี	น้ำตาล	น้ำตาล	ส้ม
	I.S.	ปานกลาง	ส้ม	เหลืองอมส้ม	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาล	เหลืองอมส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	ส้มจาง	ส้มจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	น้ำตาล	เหลืองอมส้ม	-
	P.I.A.	ดี	น้ำตาล	เหลืองอมส้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทนกลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สิ่งควักดู
III/MW4-1	Y.M.	ดี	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลอ่อน
	O.M.	ดี	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลอ่อน
	I.S.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
	T.A.	น้อย	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
	Glu.A.	ดี	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
	N.A.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลอ่อน
	P.I.A.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	น้ำตาลส้ม	-
IV/KPI-1	Y.M.	ดี	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-
	O.M.	ดี	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-
	T.A.	น้อย	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่สร้าง	เหลืองจาง	-
	Glu.A.	ดี	ไม่สร้าง	เหลืองจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่สร้าง	เหลืองจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-
	P.I.A.	ดี	ไม่สร้าง	ส้มอมเหลือง	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทนกลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
V/KJP8-1	Y.M.	ดี	เทาดำ	น้ำตาลอมเหลือง	-
	O.M.	ดี	เทาดำ	น้ำตาลอมเหลือง	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอมเหลือง	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เทาดำ	น้ำตาลอมเหลือง	-
	P.I.A.	ปานกลาง	เทาดำ	น้ำตาลอมเหลือง	-
VI/MW4-36	Y.M.	ดี	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดี	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่สร้าง	ขาวขุ่น	-
	Glu.A.	ดี	ไม่สร้าง	ขาวขุ่น	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่สร้าง	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	ไม่สร้าง	เหลืองอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

















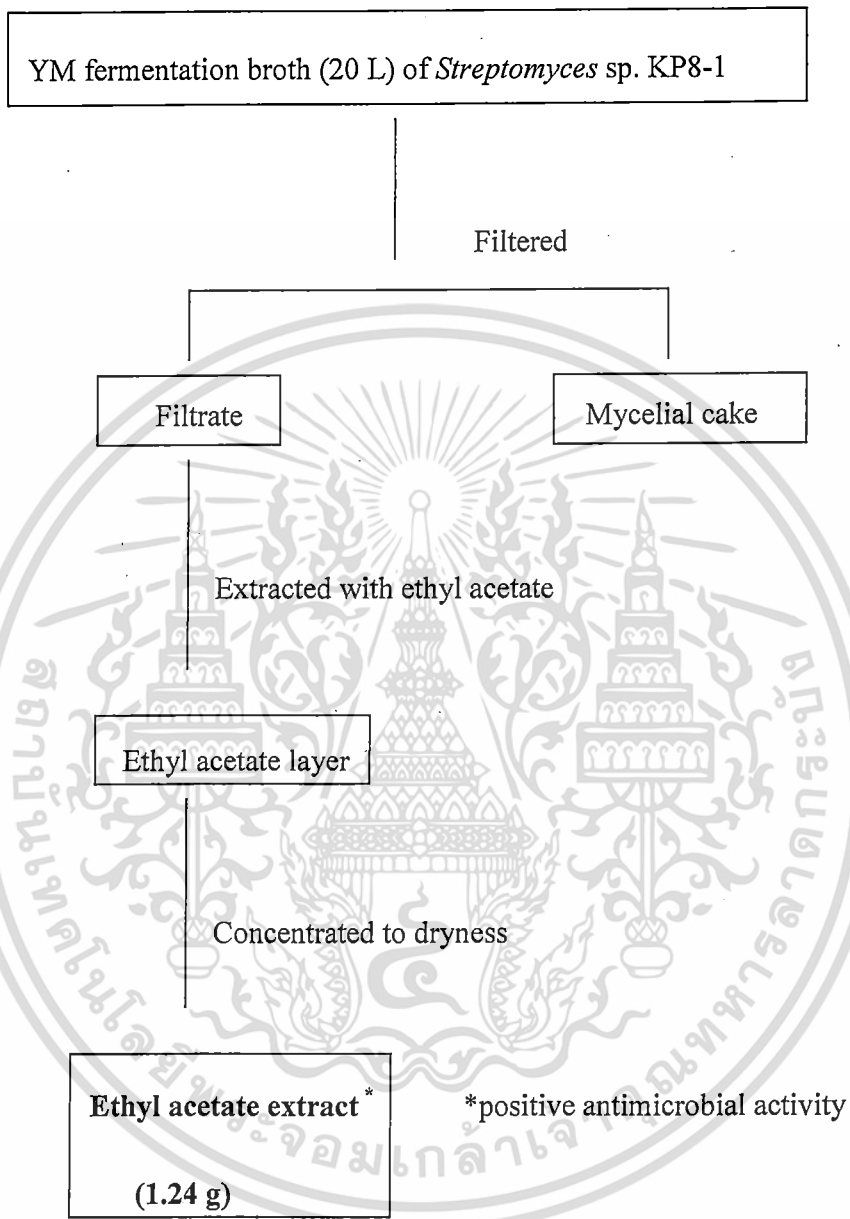




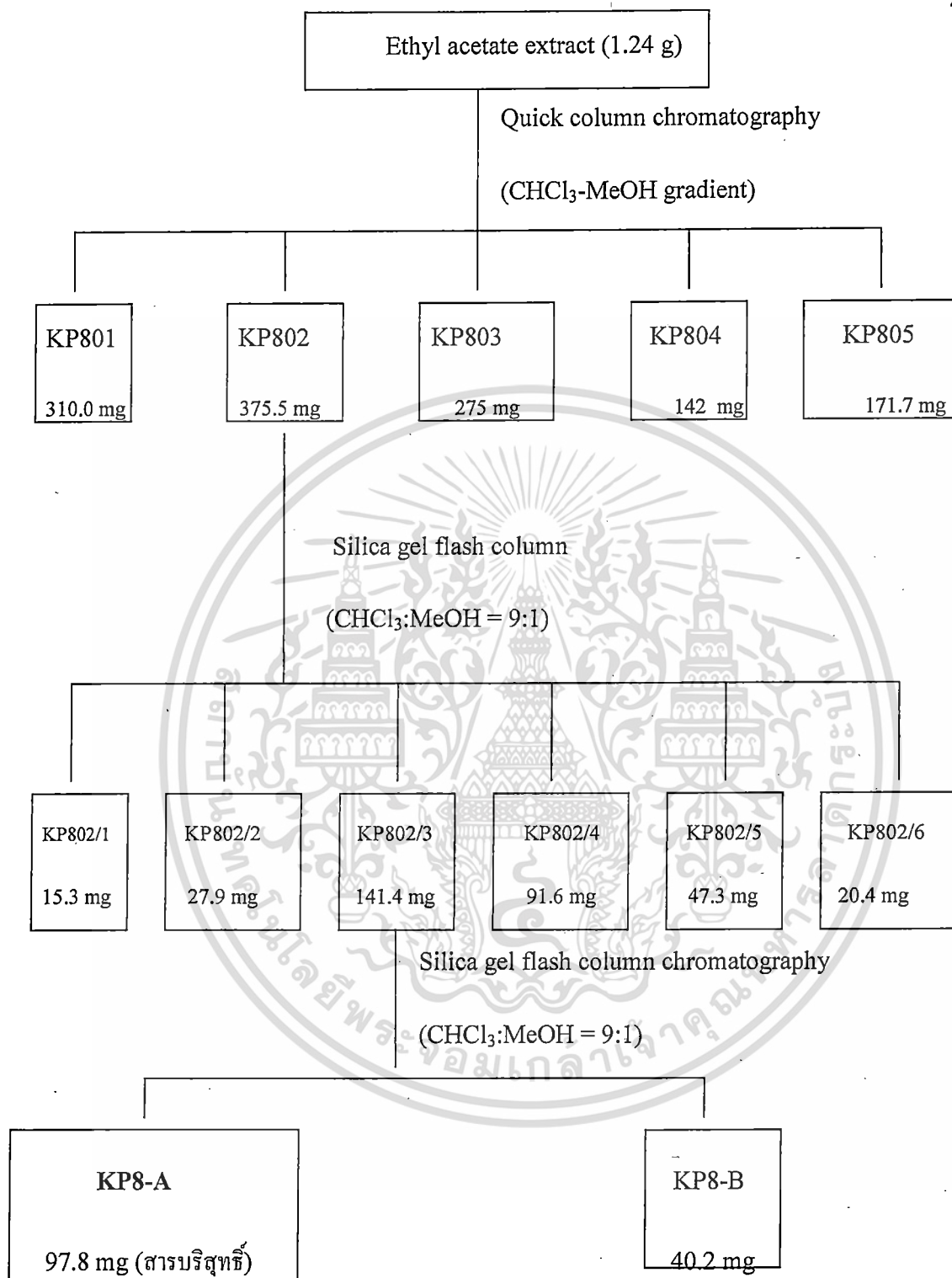


การผลิตสารทุติยภูมิ การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก

จากเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 101 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีแทบทุกชนิดรวมทั้งเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* จึงเลือกเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 20 ลิตร และนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อตัวแทนกลุ่ม 5 ปริมาณ 1.24 กรัม ได้ทำการแบ่งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่า สารสกัดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อยีสต์ทดสอบได้ดี จึงได้นำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคแฟลตสอกลัมโครมาโตกราฟีโดยใช้ Silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.063-0.2 mm เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ KP8-A ปริมาณ 97.8 มิลลิกรัม ดังแสดงในรูปที่ 22 จากนั้นได้ทำการนำสาร KP8-A มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารบริสุทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดี



รูปที่ 11 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ *Streptomyces* sp. KP8-1

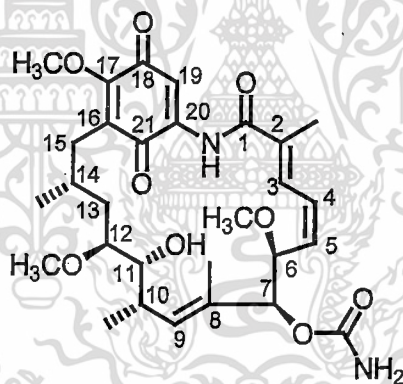


รูปที่ 12 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ *Streptomyces* sp.

KP8-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร KP8-A มีลักษณะเป็นผงสีส้มเหลือง เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESI-TOF mass ปรากฏ pseudomolecular ion peak ที่  $m/z$  583.2667 ( $M+Na$ )<sup>+</sup> ซึ่งสามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_{29}H_{40}N_2O_9Na$  จากข้อมูลของ IR absorption spectrum แสดงข้อมูลของ  $3,450\text{ cm}^{-1}$  (O-H stretching),  $1,689\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching) and  $1,649\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching, amide I band) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ด้วยเทคนิค NMR พบว่า ข้อมูลทาง  $^1\text{H}$  NMR แสดงให้ทราบว่า สาร KP8-A ประกอบไปด้วย 4 methyl protons, 3 methoxy protons, 2 methylene protons, 11 methine protons และ 3 exchangeable protons ข้อมูลทาง  $^{13}\text{C}$  NMR สรุปได้ว่าสารนี้ประกอบไปด้วยคาร์บอนจำนวน 29 อะตอม จากข้อมูลของ DEPT135 และ HMQC สามารถระบุชนิดของคาร์บอนของสาร KP8-A ได้ว่า สารนี้ประกอบด้วย 4 methyl carbons, 3 methoxy carbons, 2 methylene carbons, 11 methine carbons และ 9 quaternary carbons นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของ  $^{13}\text{C}$  NMR พบว่าสารนี้แสดงสัญญาณของ 2 quinone carbonyl carbons, 1 amide carbonyl carbon และ 1 carbamate carbon จากการเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารนี้ได้เป็น สารเจลดานามัยซิน (ตารางที่ 7)



รูปที่ 13 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร KP8-A

จากการนำสาร KP8-A มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC10231 ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ต่อการเจริญที่ 1, <0.03, 1, 8 และ  $16\ \mu\text{g ml}^{-1}$  ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6. การเปรียบเทียบข้อมูลของ  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ระหว่างสาร KP8-A และสารเจลดานามัยซิน

Position	KP8-A <sup>a</sup>		Geldanamycin	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult, ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult <sup>c</sup>
1	167.91	-	169.1	-
2	134.56	-	133.2	-
2-Me	12.5	1.87, 3H, s	12.2	1.91, 3H
3	126.89	6.91, d, (12)	128.4	6.95, d
4	126.11	6.54, t, (12, 11)	125.7	6.56, t
5	136.2	5.82, t, (11, 10)	137.8	5.80, t
6	81.23	4.27, d, (10)	81.6	4.34, d
6-OMe	57.3	3.31, 3H, s	56	3.22, 3H, s*
7	81.62	5.21, brs	80.6	4.86, brs
7-CONH <sub>2</sub>	155.75	4.89, NH <sub>2</sub> , brs	156	6.45, NH <sub>2</sub> , brs
8	133.1	-	132.6	-
8-Me	13	2.01, 3H, s	12.5	1.61, 3H, brs
9	132.94	5.97, d, (10)	131.9	5.51, d
10	32.26	3.12, m	32.1	3.61
10-Me	12.66	1.01, 3H, d, (7)	23.3	0.97, 3H, d <sup>d</sup>
11	72.6	3.58, m	71.9	3.29**
11-OH	-	3.41, OH, brs	-	-
12	80.91	3.61, m	80.2	3.07**
12-OMe	56.75	3.31, 3H, s	56.5	3.23, 3 H, s*
13	34.74	1.83, 2H, m	31	1.45, 2H, brs
14	27.97	1.73, brs	26.6	1.91
14-Me	23.04	0.98, 3H, d (6)	13	0.76, 3H <sup>d</sup>
15	32.83	2.52, 2H, m	31.7	2.42, 2H, m
16	127.39	-	128.1	2.42, m
17	156.73	-	156.4	-
17-OMe	61.68	4.10, 3H, s	61	3.93, 3H, s
18	183.85	-	183.6	-
19	111.6	7.44, s	110.9	7.02, s
20	137.84	-	139.6	-
21	184.68	-	183.1	-
NH	-	8.72, NH, brs	-	9.14, NH, brs

<sup>a</sup>observed in CDCl<sub>3</sub> and recorded at 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).<sup>b</sup>observed in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Omura *et al.*, 1979)<sup>c</sup>observed in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Rinehart, Jr. And Shield, 1976)

\*, \*\*, # interchangeable signals

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน ทราบ และซากใบไม้ บริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 101 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากออกเป็น 6 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีในโทนส้มถึงน้ำตาล เส้นใยอาหารสีน้ำตาลแดง เส้นใยแตกกิ่งก้าน มีลักษณะซิกแซก สร้างสปอร์สายสั้นตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Nocardia*

กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศในโทนสีขาวอมเทาจนถึงดำ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง และลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ พบว่ามีสปอร์แรงเฉียบรูปท่อนลักษณะคล้ายนิ้วมือรวมอยู่กันเป็นช่อ ภายในมีสปอร์รูปร่างรี สามารถเคลื่อนที่ได้ และพบ globose body จำนวนมาก มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Dactylosporangium*

จากเชื้อแอคติโนมัยซีทข้างต้น ได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลต MW4-36 มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียด พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Dactylosporangium maewongense* ในระดับ 99.4 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลตนี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Dactylosporangium*

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 101 ไอโซเลต ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า สิ่งสกัดขยายในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อกลุ่มที่ 1 2 3 และ 5 (83.9% ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด) แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ตีพบว่า เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 สามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน (geldanamycin) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้พบความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทค่อนข้างน้อยซึ่งค้นพบเพียง 4 สกูด เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างมีส่วนสำคัญกับการกระจายตัวของเชื้อ การวิจัยครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างในฤดูร้อน ลักษณะป่าที่เก็บตัวอย่างค่อนข้างแห้งจึงอาจไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสิทกลุ่มอื่น ถึงแม้การวิจัยครั้งนี้พบความหลากหลายของเชื่อน้อย แต่ยังคงพบเชื้อที่ยังสามารถเจริญและทนต่อสภาวะแห้งได้และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีซึ่งถือว่าเป็นแหล่งของทรัพยากร จุลินทรีย์ที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้าน วิทยาศาสตร์สาธารณสุข จากข้อมูลที่ได้ในงานวิจัยครั้งนี้พบเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถผลิตสารสำคัญ ซึ่งแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี จึงควรทำการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวให้ดีไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อใช้เป็น แหล่งผลิตสารปฏิชีวนะและควรนำสารกลุ่มดังกล่าวไปศึกษาความเป็นพิษและปรับปรุงโครงสร้างเพื่อ พัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะในอนาคตต่อไป



## ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

### บทความวิจัย

1. Thawai, C. 2011. *Dactylosporangium siamese* sp. nov., isolated from soil of Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (In preparation) (Impact factor = 2.26)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes*. Japan.
- Asolkar, R. N., Schroder, D., Heckmann, R., Lang, S., Wagner-Dobler, L. H. 2004. Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hell. *J Antibiot* (Tokyo). 57:17-23.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics*. 58: 1-26.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathomaree, W., Goodfellow, M., Bull, A. T., Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A., Bolek, W. 2005. Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot*. (Tokyo). 58:346-349.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., Carter, G. T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 67:1431-1433.
- Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.
- 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.
- Feling, R. H., Buchanan, G.O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42:355-357.
- Francioli, M., J. Bille, M. Glauser, and P. Moreill. 1991. Beta-lactam resistance mechanism of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis*. 163, 514-523.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol*. 37: 189-216.
- Hernández, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck, R. G. S., Ferreira, A. G. and Godinho, M. J. L. 2004. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 441
- 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.
- Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S., Kobayashi, M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J Nat Prod.* 66:1373-1377.
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmucins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot (Tokyo).* 58:289-292.
- Kim, S.H., S.C. Kim, S.B. Gu, J.H. Shin, S.P. Shu, and D.W. Ryang. 1995. Four cases of vancomycin-resistant enterococci infection. *Kor. J. Clin. Pathol.* 15, S265.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology.* 19: 161-207.
- Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus '*Marinispora*'. *J Am Chem Soc.* 128:1622-1632.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. pp. 161-207. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- Macherla, V. R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod.* 68:780-783.
- 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.
- Maskey, R. P., Sevvana, M., Uson, I., Helmke, E., Laatsch, H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43:1281-1283.
- Mitchell, S. S., Nicholson, B., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2004. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*. *J Nat Prod.* 67:1400-1402.
- 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.

- Pimentel-Elardo, S. M., Tobias, A. M., Gulder, J., Hentschel, U., Bringmann, G. 2008. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*. *Tetrahedron Letters*. 49:6889–6892.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B. and Bischoff, D. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J Antibiot* (Tokyo). 57:271-279.
- Sanchez Lopez, J. M., Martinez, I. M., Perez, B. J., Fernandez, P. J. L. and CanedoHernandez, L. M. 2003. New Cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J Nat Prod*. 66:863-864.
- 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.
- Soria-Mercado, I. E., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod*. 68:904-910.
- Stritzke, K., Schulz, L. H., Helmke, E. and Beil, W. 2004. Novel caprolactones from a marine streptomycete. *J Nat Prod*. 67:395-401.
- Suchada, J., Tanasupawat, S., Kitakoop, P., Bavovada, R., Kobayashi, H. and Kudo, T. 2006. Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain. *Actinomycetologica*. 20:10–14.
- 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.

- Thawai, C., Kittakoop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K., Thebtaranonth.  
2004. Micromonosporin A, a Novel 24-Membered Polyene Lactam Macrolide from  
*Micromonospora* sp. Isolated from Peat Swamp Forest. *Chemistry and Biodiversity*. vol. 1,  
640-645.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2004.  
*Micromonospora aurantinigra* sp. nov., Isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand.  
*Actinomycetologica*. vol. 18 no.1, 8-14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T. 2005.  
*Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol.*  
*Microbiol.* 55: 417-422 (JIF impact factor = 3.18)
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2005.  
*Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl.*  
*Microbiol.* 51: 229-234. (JIF impact factor = 0.9)
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. and Kudo, T. 2006. *Actinocatenispora* gen. nov., a new  
member of the family *Micromonosporaceae*, with description of *Actinocatenispora*  
*thailandica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1789-1794.
- 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.
- Van den Boogaard, A.E. and E.E. Stobberingh. 1996. Time to ban all antibiotics as animal growth-  
promoting agents? *Lancet* 31; 619
- 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.
- Wampler, J.L., S.A. Martin, and G.M. Hill. 1998. Effects of laidlomycin propionate and monensin on  
glucose utilization and nutrient transport by *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*.  
*J. Anim. Sci.* 76, 2730-2736.
- 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. 1977. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method*  
*in Microbiology*, 4<sup>th</sup> edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.

Yoo, J. C., Kim, J. H., Ha, J. W., Park, N. S., Sohng, J. K., Lee, J. W., Park, S. C., Kim, M. S. and Seong, C. N. 2007. Production and Biological Activity of Laidlomycin, Anti-MRSA/VRE Antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *The Journal of Microbiology*, 45, 6-10.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้นำเตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่หนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นการเตรียมน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ความร้อนฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 1. Sodium-caseinate agar (SCN)

Sodium caseinate	0.2	กรัม
Glucose	0.1	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.02	กรัม
Agar	1.5-1.8	กรัม

#### 2. Yeast extract-malt extract agar (YMA), ISP medium no.2

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Agar	1.5	กรัม
pH 7.3		

#### 3. Oatmeal agar, ISP medium no. 3

Oatmeal	2.0	กรัม
Agar	1.8	กรัม

#### 4. Inorganic salts-starch agar, ISP medium no. 4

Soluble starch	1.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	กรัม
$\text{CaCO}_3$	0.2	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม
pH 7.0-7.4		

## 5. Glycerol-asparagine agar, ISP medium no.5

Glycerol	1.0	กรัม
L-Asparagine	0.1	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม

## 6. Tyrosine agar, ISP medium no. 7

Glycerol	1.5	กรัม
L-Tyrosine (Difco)	0.05	กรัม
L-Asparagine (Difco)	0.1	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม

pH 7.2-7.4

Trace salt solution (A)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Peptone KNO<sub>3</sub> broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
pH 7.0		

## 8. Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

Carbohydrate	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.264	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.565	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhydrous	0.238	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts (B)	0.1	มิลลิกรัม
Agar	1.5	กรัม
pH 6.8-7.0		
Trace salts solution (B)		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.64	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.11	กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.79	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15	กรัม

## 9. Boullion gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
pH 7.0-7.2		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 10. Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	10.0	กรัม
-------------------	------	------

## 11. Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	30	กรัม
--------------------	----	------

Casamino acid, Technical	1.75	กรัม
--------------------------	------	------

Starch	0.15	กรัม
--------	------	------

Agar	1.7	กรัม
------	-----	------

pH 7.3

## 12. Sabouraud's dextrose agar (Difco)

Neopeptone	1.0	กรัม
------------	-----	------

Dextrose	4.0	กรัม
----------	-----	------

Agar	1.5	กรัม
------	-----	------

pH 5.6-5.8

## 13. Seed medium

Yeast extract	0.4	กรัม
---------------	-----	------

Glucose	0.4	กรัม
---------	-----	------

Malt extract	1.0	กรัม
--------------	-----	------

pH 7.3

## 14. Production medium

Yeast extract	0.4	กรัม
---------------	-----	------

Glucose	0.4	กรัม
---------	-----	------

Malt extract	1.0	กรัม
--------------	-----	------

CaCO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
-------------------	-----	------

pH 7.3

## 15. Peptone-yeast extract iron agar

Bacto-Peptide Iron Agar, dehydrated (Difco)	3.6	กรัม
Bacto-Yeast Extract (Difco)	0.1	กรัม
pH 7.0-7.2		

## 16. Glucose asparagine agar

Glucose	1	กรัม
Asparagine	0.05	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	กรัม
Bacto-agar	1.5	กรัม
pH 6.8-7.0		

## 17. Nutrient agar

Meat extract	1	กรัม
Peptone	1	กรัม
NaCl	0.1-0.2	กรัม
Agar	1.5	กรัม

## 18. Czapek's sucrose agar

Sucrose	3	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.05	กรัม
KCl	0.05	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.001	กรัม
Agar	1.5-1.7	กรัม
pH 7.0-7.2		

## 19. phosphate buffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.680	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.71	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DW. 1 ลิตร

\*\*ใช้  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นตัวปรับพีเอช

## 20. Humic acid Vitamin Agar

Humic acid	1 กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.5 กรัม
KCl	1.71 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิกรัม
$\text{CaCO}_3$	20 มิลลิกรัม
Vitamin B	10 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
DW.	1 ลิตร
pH 7.3	
เกลือ 3 เปอร์เซนต์	
** Humic acid ละลายใน 10 มล. 0.2N NaOH	
**Vitamin B	
Thiamine-HCl	10 มิลลิกรัม
Riboflavin	10 มิลลิกรัม
Nicotinate	10 มิลลิกรัม
Pyridoxine-HCl	10 มิลลิกรัม
Inositol	10 มิลลิกรัม
Ca-Pantprenalate	10 มิลลิกรัม
p-Aminobenzoate	10 มิลลิกรัม
d-Biotin	5 มิลลิกรัม
DW	200 มิลลิลิตร