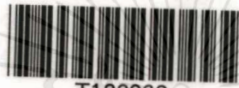


สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ
แอกติโนมัยสัท ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินในประเทศไทย

SCREENING AND PRELIMINARY TAXONOMIC STUDY OF
ANTIBIOTIC-PRODUCING ACTINOMYCETES ISOLATED FROM
SOILS OF THAILAND



T122938



จิราพร

ใจตรง

เมทนี

มุลศรี

สุภาพร

เนินหอม

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....122938
วัน, เดือน, ปี. 26. ก.ย. 2555

b. 12/43 2143
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2554

**SCREENING AND PRELIMINARY TAXONOMIC STUDY OF
ANTIBIOTIC-PRODUCING ACTINOMYCETES ISOLATED FROM
SOILS OF THAILAND**



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY PROGRAM
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2011**

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ
แอกติโนมัยซีท ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินของประเทศไทย
Screening and preliminary taxonomic study of antibiotic-producing
actinomycetes isolated from soil of Thailand

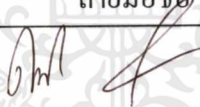


ชื่อนักศึกษา นางสาวจิราพร ใจตรง
นายเมทธิ มุลศรี
นางสาวสุภาพร เนินหอม

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. จิตติ ท่าไผ่

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2554

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร.จิตติ ท่าไผ่	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินของประเทศไทย		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจิราพร ใจตรง	รหัส	51050237
	นายเมทนี มุลศรี	รหัส	51050301
	นางสาวสุภาพร เนินหอม	รหัส	51050329
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2554		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว		

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ KL-A-5-2 KL-B-2-11 และ KL-B-3-3 ถูกแยกจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และ 10 ไอโซเลต ได้แก่ BK1-2 BK1-4 BK2-1 BK2-2 BK2-7 BK5-11 BK9 G17 G20-4 และ NON6-2 แยกจากดินบริเวณจังหวัดกรุงเทพมหานคร เชื้อเหล่านี้ถูกกำหนดโดยการวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ และลักษณะทางจีโนมที่ซึ่งวิเคราะห์ลำดับของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene บางส่วน สามารถจำแนกเชื้อออกเป็น 4 สกุล คือ *Streptomyces* *Actinomadura* *Micromonospora* และ *Nocardia* น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) และเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 8 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 61.54) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทางด้านเภสัชกรรมได้ในอนาคต

คำสำคัญ แอคติโนมัยซีท ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene กิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Title	Screening and preliminary taxonomic study of antibiotic-producing actinomycetes isolated from soil of Thailand	
Students	Jiraporn	Jaitrong
	Metinee	Moonsri
	Supaporn	Noenhom
Degree	Bachelor of Science	
Major Program	Biotechnology	
Academic Year	2011	
Advisor	Asst.Prof.Dr. Chitti Thawai	

ABSTRACT

Three actinomycete strains KL-A-5-2 KL-B-2-11 and KL-B-3-3 were isolated from soils in Khlong Lan National Park, Kamphaeng Phet province and ten actinomycete strains BK1-2 BK1-4 BK2-1 BK2-2 BK2-7 BK5-11 BK9 G17 G20-4 and NON6-2 were isolated from soils in Bangkok. All actinomycete strains were determined using a procedure with the combination of morphological, cultural and partial 16S rRNA gene sequence analyses. Actinomycete strains could be classified into four genera *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora* and *Nocardia*. The fermentation broths of all actinomycete strains were tested for anti-microbial activities using agar well diffusion and agar disc diffusion methods. The result revealed that eight actinomycete isolates (61.54%) could inhibit the growth of test microorganism, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. This result implied that the actinomycetes from soils are important source of bioactive compounds and could be pharmaceutically developed for the further studies.

Keyword : Actinomycetes, 16S rRNA gene sequence, antimicrobial activity

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ทำโว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา
ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรูปเล่มโครงการพิเศษให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี
กรรมการ ที่กรุณาตรวจทานและพิจารณาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน และให้คำแนะนำตลอดการศึกษา
รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ห้องธุรการสาขาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน
ที่ช่วยเหลือ และแนะนำการดำเนินงานต่างๆ

ขอขอบพระคุณที่ปรึกษาโทและปรึกษาเอกที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำทุกๆด้าน ทำให้
การดำเนินงานผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่ให้การช่วยเหลือด้านต่างๆระหว่างการดำเนินงาน และให้กำลังใจที่ดีมา
โดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาที่กรุณาอบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนในทุกๆ
ด้านทำให้ผู้จัดทำสามารถสำเร็จการศึกษาได้ด้วยดี

จิราพร ใจตรง

เมทนี มุลศรี

สุภาพร เนินหอม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes).....	3
2.1.1 สันฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท.....	3
2.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท	8
2.2.1 ลักษณะทางสันฐานวิทยา.....	8
2.2.2 ลักษณะการเจริญบนอาหาร	8
2.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	9
2.2.4 ลักษณะการจำแนกทางเคมี	9
2.2.5 ลักษณะทางจีโนมไทป์	11
2.3 อนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....	12
2.4 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....	20
2.4.1 ด้านสิ่งแวดล้อมและนิเวศวิทยา.....	20
2.4.2 ด้านเกษตรกรรม.....	20
2.4.3 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม.....	20
2.5 การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีท.....	20
2.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ	22
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 อุปกรณ์	25
3.2 สารเคมี	25
3.3 วิธีการทดลอง	26
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อและการคัดแยกเชื้อ	26
3.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ	29
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธีเอกาเวลคิฟิวชัน (agar well diffusion)	29
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion)	30
3.3.5 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition).....	32
3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) บนสายดีเอ็นเอ.....	32
3.3.7 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	60
เอกสารอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก ก.....	66
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	72
ภาคผนวก ง.....	81
ภาคผนวก จ.....	83
ภาคผนวก ฉ.....	88
ภาคผนวก ช.....	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	33
3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene	34
4.1 รหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง	36
4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 21 วัน	43
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar well diffusion	55
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar disc diffusion	57



สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างเส้นใยของแอสคิโนมัซีท	4
2.2 ลักษณะของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ	5
2.3 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอสคิโนมัซีท	5
2.4 ลักษณะโคโลนีของแอสคิโนมัซีท	6
2.5 ลักษณะของสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) และสปอร์แบบสายโซ่สั้น (short chain)	7
2.6 ลักษณะของสปอร์สายโซ่ยาว (long chain) ของสเตรปโตมัซีต (<i>Streptomyces</i>)	8
2.7 อนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอสคิโนแบคทีเรีย	12
2.8 โครงสร้างของนิสตาติน (nystatin)	12
2.9 โครงสร้างของสเปคตินอไมซิน (spectinomycin)	21
2.10 ลักษณะการวางแผ่นทดสอบ (disc) ในการทำ disc diffusion	23
3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต	30
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KL-A-5-2	37
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KL-B-2-11	37
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KL-B-3-3	38
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK1-2	38
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK1-4	39
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK2-1	39
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK2-2	40
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK2-7	40
4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK5-11	41
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BK9	41
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต G17	42
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต G20-4	42
4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต NON6-2	43
4.14 ตำแหน่งของเชื้อ KL-A-5-2 บน phylogenetic tree	48
4.15 ตำแหน่งของเชื้อ KL-B-2-11 บน phylogenetic tree	49
4.16 ตำแหน่งของเชื้อ BK1-2 บน phylogenetic tree	50

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.17 ตำแหน่งของเชื้อ G17 บน phylogenetic tree.....	51
4.18 ตำแหน่งของเชื้อ BK2-1 BK2-2 และ BK2-7 บน phylogenetic tree	52
4.19 ตำแหน่งของเชื้อ KL-B-3-3 NON6-2 และ BK1-4 บน phylogenetic tree	53
4.20 ตำแหน่งของเชื้อ BK9 และ G20-4 บน phylogenetic tree	54



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันโรคที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านั้นเกิดการกลายพันธุ์ทำให้เชื้อโรคเกิดการด้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่จากแหล่งตัวอย่างใหม่ จึงเป็นความหวังสำคัญที่จะค้นพบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะใหม่ แอคติโนมัยีสท์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือ สร้างเส้นใยแตกกิ่งก้านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร สร้างสปอร์ชนิดไม่อาศัยเพศ ลักษณะสปอร์จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป สามารถพบในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์เป็นจำนวนร้อยละ 10 ถึง 50 ของจุลินทรีย์ที่พบในดิน จำนวนและชนิดของแอคติโนมัยีสท์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ภายในดิน เช่น อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง ชนิดของดิน ความลึกของหน้าดิน จากข้อมูลของ Bèrды (2005) พบว่า เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยีสท์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.72 รองลงมาคือเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น (Bèrды, 2005) และยังมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศน์ คือ เป็นตัวย่อยสลายอินทรีย์สารซึ่งเป็นการทำให้เกิดความสมดุลและความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศน์

ป่าเขตร้อน (Tropical Forest) ประกอบด้วยป่าหลายประเภท เช่น ป่าดงดิบชื้น ป่าดงดิบเขา ป่าดงดิบแล้ง ป่าสนเขา ป่าชายเลน ป่าพรุ ป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณ เป็นต้น ป่าแต่ละประเภทนั้นต่างมีเอกลักษณ์พิเศษเฉพาะตัวรวมทั้งมีปัจจัยกำหนดการเกิดและการดำรงอยู่แตกต่างกันหลายประการทำให้สามารถแบ่งป่าเขตร้อนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ป่าไม่ผลัดใบ (Evergreen Forest) และป่าผลัดใบ (Deciduous Forest) คือ บริเวณใดที่มีฝนตกชุกตลอดปีมีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่า 1,500 มิลลิเมตรต่อปีป่าเขตร้อนที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็น ป่าดิบ หรือ ป่าไม่ผลัดใบ มีสภาพรกรทึบเขียวครึ้มตลอดปี เป็นป่าที่มีพืชพันธุ์และสัตว์ป่าหลากหลายเพราะลักษณะอากาศและอุณหภูมิที่ค่อนข้างคงที่ ส่วนป่าเขตร้อนที่มีลักษณะอากาศแบบมรสุม คือ มีฤดูแบ่งแยกชัดเจนมีฤดูแล้งยาวนาน ต้นพืชต้องพักตัวลงหัวหรือผลัดใบทิ้งเพื่อลดปริมาณการคายน้ำในฤดูแล้ง เกิดเป็นป่าผลัดใบ (Deciduous Forest) ขึ้น

ป่าเขตร้อนได้รับการยอมรับว่าเป็นสังคมของสิ่งมีชีวิตที่มีความสลับซับซ้อนมากที่สุดและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงที่สุด บริเวณพื้นที่ของป่าเขตร้อนจะมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ทั้งที่มีขนาดใหญ่ ขนาดเล็ก ตัวอย่างเช่น พวกเชื้อราหรือจุลินทรีย์ในดิน ซึ่งสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ก็มีส่วนสำคัญในการต่อ

เดิมระบบนิเวศน์ให้สมบูรณ์ จากความหลากหลายทางชีวภาพของป่าเขตร้อนจึงทำให้เป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการศึกษาทางด้านทรัพยากรจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ (<http://www.tropicalforest.or.th>)

ดังนั้น โครงการพิเศษนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ จากตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าเขตร้อน บริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และตัวอย่างดินในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและมีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท อาจทำให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ และนำไปสู่การค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางการแพทย์และด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อทำการแยกและคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณต่างๆของป่าเขตร้อนบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชรและตัวอย่างดินในจังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. เพื่อศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดกรองได้
3. เพื่อศึกษาการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีท

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินในป่าเขตร้อนบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชรและตัวอย่างดินในจังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. ทำการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทำการคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้
2. สามารถรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่แยกได้เพื่อไปเป็นข้อมูลในการศึกษาและวิจัยด้านอื่นต่อไป
3. การวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ซึ่งสามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ชนิดใหม่ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยซิต (Actinomycetes)

ชื่อ “actinomycete” มาจากภาษากรีก ระหว่างคำว่า “akktis” แปลว่า รังสีบีม (ray beam) และคำว่า “mykes” แปลว่า รา (fungus) เชื้อแอคติโนมัยซิตจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกลักษณะ สัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือ มีเส้นใยแตกกิ่งออกมาและบางชนิดมีการสร้างสปอร์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มี ปริมาณเบสกวานีนกับไซโตซีนสูง (มากกว่าร้อยละ 50) เชื้อแอคติโนมัยซิตมีหลายสปีชีส์ที่สามารถ ผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น สารต้านมะเร็ง สารปฏิชีวนะที่ใช้ในด้านการแพทย์ เกษตวิทยา และเกษตรกรรม

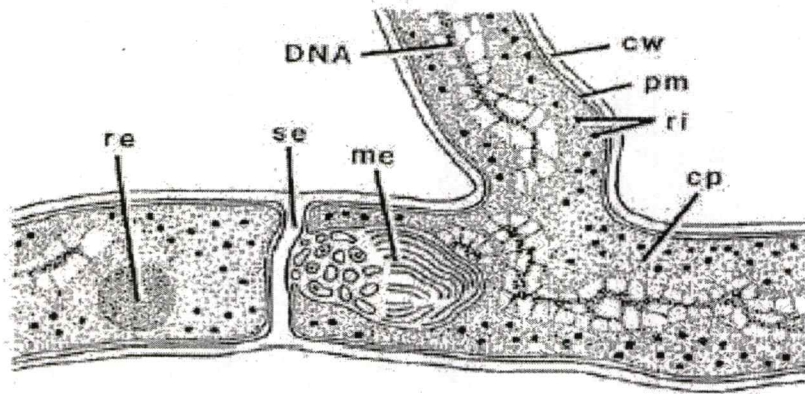
แอคติโนมัยซิตดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก น้ำโคลนตม และบริเวณรากพืช แบคทีเรียนี้ ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุจากซากพืชซากสัตว์ให้เป็นสารใหม่กลับคืนสู่สิ่งแวดล้อมและเป็นแบคทีเรียที่ มีประโยชน์ในหลายด้าน โดยธรรมชาติ ปริมาณของแบคทีเรียแอคติโนมัยซิตที่พบในดินขึ้นอยู่กับ ชนิดและสภาพของดินการเจริญของแอคติโนมัยซิตถูกยับยั้งได้ด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียแต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของรา แอคติโนมัยซิตมีบทบาทที่ สำคัญ คือ ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยย่อยส่วนประกอบของพืช และสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน

วัฏจักรของแอคติโนมัยซิตจะเริ่มจากการสร้างเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร เพื่อใช้สารอาหารใน การเจริญเติบโต และภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์ หรือในกรณีที่มีการขาด อาหาร การขาดน้ำหรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (เกษมและคณะ, 2552)

2.1.1 สัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซิต

2.1.1.1 เส้นใย (mycelium)

แอคติโนมัยซิตมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายราแต่มีขนาดเล็กกว่า ขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1.5 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเส้นใยแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและมีการเจริญโดย สามารถแตกแขนงบริเวณปลาย โครงสร้างหลักในเส้นใยพบว่าในไซโตพลาสซึมจะประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆรวมอยู่ด้วยกัน โดยส่วนของผนังเซลล์ที่อยู่ติดกับส่วนของ ไซโตพลาสซึมทำให้เกิดเป็นมิโซโซม ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ติดกับโครงสร้างของผนังเซลล์ ผนังเซลล์ ของเส้นใยมีคุณสมบัติเป็นผนังชั้นเดียว ความหนาประมาณ 10 ถึง 20 นาโนเมตร และมีการสร้าง ผนังกันหรือเรียกว่า septum ซึ่งสร้างในขณะที่เส้นใยเจริญ (เกษมและคณะ, 2552)



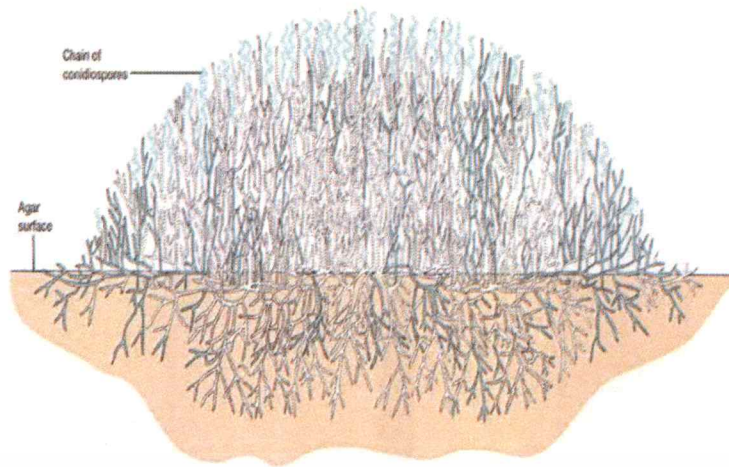
รูปที่ 2.1 โครงสร้างเส้นใยของแอกติโนมัยซีท

cp = ไซโตพลาสซึม pm = พลาสมาเมมเบรน cw = ผนังเซลล์ me = มีโซโซม
se = ผนังกันเซลล์ ri = ไรโบโซม DNA = นิวคลีโอออยด์ re = บริเวณแหล่งพลังงาน

ที่มา : Vobis (1997)

การแตกสาขาของเส้นใยเป็นแบบ monopodial เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด พบในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) แบบ dichotomous พบในสกุลแอกติโนมัยซีท (*Actinobifida*) และแบบ verticillate พบในสกุลสเตรปโตเวติซิลเลียม (*Streptoverticillum*) เส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท แบ่งเป็นสองชนิด คือ

- 1) เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เป็นเส้นใยที่แข็งแรงเนื่องจากต้องใช้แทงลงในอาหารหนาประมาณ 10 ถึง 20 นาโนเมตร
- 2) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะที่อ่อนนุ่มเนื่องจากมีชั้นของไฟบรัสหุ้ม (fibrous sheath) มีลักษณะที่แตกต่างจากเส้นใยอาหาร คือ
 - เส้นใยอากาศมีผนังบางกว่าเส้นใยอาหาร
 - เส้นใยอากาศมักมีสีเข้มกว่า มีการสร้างรงควัตถุ (pigment)
 - มีการแตกสาขา (branching) น้อยกว่าเส้นใยอาหาร
 - เส้นใยอากาศมีการสร้างสปอร์และการแตกกิ่งก้านของเส้นใย
 - เส้นใยอากาศเป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ

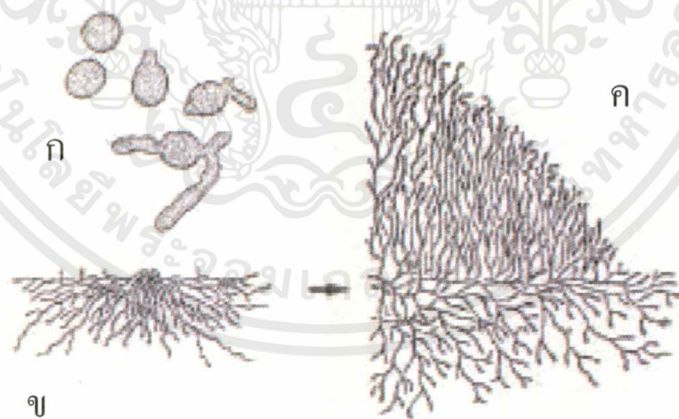


รูปที่ 2.2 ลักษณะของเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และ เส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

ที่มา : <http://classroom.sdmesa.net/eschmid/Lecture16-Microbio.htm> (8/10/2554)

2.1.1.2 โคลโลนี (colony)

โคลโลนีของแอคติโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใย ทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นเกิดเป็นโคลโลนีสำหรับการสร้างโคลโลนีเริ่มจากการลงเชื้อในอาหารแข็ง อาจเกิดจากสปอร์ อับสปอร์ ส่วนของเส้นใย (รูปที่ 2.3ก) จากนั้นพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร (รูปที่ 2.3ข) และเจริญโดยการแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศ (รูปที่ 2.3ค) ต่อมาได้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคลโลนี เช่น การสร้างสปอร์



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการสร้างโคลโลนีของแอคติโนมัยซีท

ที่มา : Vobis (1997)

ลักษณะของโคลโลนีมีความแตกต่างกันบางสายพันธุ์อาจมีลักษณะนูนแบนติดกับอาหารแข็งหรือบางสายพันธุ์มีลักษณะเป็นแผ่นราบผิวหน้าอาจจะเรียบ แตก ขรุขระ นูน เที้ยย่น หรือเป็นเม็ดเล็กๆ โคลโลนีของแต่ละชนิดจะมีสีที่แตกต่างกัน ส่วนการเจริญจะขึ้นเป็นแผ่นยาวตามรอยขีด ขึ้น

เป็นกระจุกอัดแน่นหรือขึ้นเป็นจุๆ กระจายๆ หรือผสมกัน ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะที่ต่างกัน คือ การเจริญในอาหารเหลวเซลล์จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่มีรูปร่างเป็นเม็ด (pellets) (ศิริรัตน์ ทองอุ่น, 2552)



รูปที่ 2.4 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยสัท

ที่มา : <http://www.sciencephoto.com/media/13149/enlarge> (8/10/2554)

<http://www.actinogen.com.au> (8/10/2554)

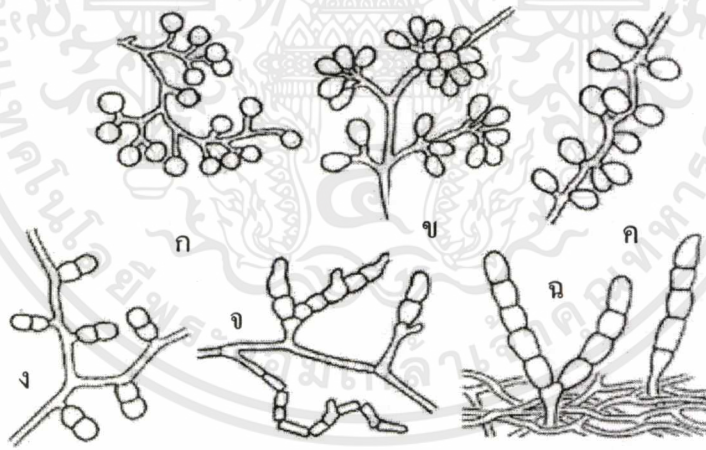
โดยทั่วไปลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเชื้อ สามารถพบได้ 3 แบบ คือ

- 1) โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวมๆ เป็นการสร้างเส้นใยอากาศปกคลุมผิวหน้าอาหาร มักพบในแอกติโนมัยสัทที่มีการเจริญในระยะ transient mycelial มีการเจริญของไมซีเลีย (mycelia) ที่ไม่แน่นอน
- 2) โคโลนีไม่มีเส้นใยอาหารมีแต่เส้นใยอากาศที่สามารถยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนที่ยึดเกาะพิเศษที่เรียกว่า holdfast
- 3) โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนังเส้นใยอากาศค่อนข้างโปร่งและยึดกับอาหารด้วยเส้นใยที่แทงลงไปอาหาร

2.1.1.3 สปอร์ (spore)

แอกติโนมัยสัทสร้างสปอร์โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบตามลักษณะโครงสร้างภายนอก คือ สปอร์เดี่ยว ลักษณะเป็นสาย และสร้างสปอร์ในอับสปอร์ สปอร์แต่ละชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสัทมีการเจริญและพัฒนาอยู่บนก้านชูสปอร์ (sporophore) ทั้งที่มีลักษณะเป็นก้านชูอันเดียวหรือแตกกิ่งก้านสาขา ซึ่งอาจแตกมาจากเส้นใยที่เจริญลงไปอาหารหรือเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ส่วนถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) ถูกสร้างอยู่บนก้านชูสปอร์ตรงบริเวณเกือบปลายหรือบริเวณปลายสุดของเส้นใย

- 1) การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้เรียกว่า monosporous พบในหลายสกุล ในสกุลเทอร์โมโมโนสปอรา (*Thermomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์
- 2) การสร้างสปอร์แบบสายโซ่สั้น (chain) พบมากในการสืบพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่และสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์แบบสายโซ่สั้นนี้ ซึ่งได้แก่ ความยาว และ/หรือจำนวนสปอร์ เช่น di/bisporous oligosporous หรือ polysporous ในการจำแนกเชื้อ เช่น การบอกความแตกต่างของสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) กับสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) หรือการบอกความแตกต่างของสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) แต่ละชนิดจากลักษณะของการสร้างสปอร์แบบสายโซ่สั้นของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)
- 3) การสร้างสปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ (sporangia/sporangium) สปอร์จะเจริญและพัฒนาอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ จนกระทั่งถึงสภาวะที่ต้องมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศถุงหุ้มสปอร์จะแตกออกและปลดปล่อยสปอร์ออกมาโดยทั่วไปถุงหุ้มสปอร์จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 50 ไมโครเมตร ถุงหุ้มสปอร์มีหลายลักษณะ เช่น ทรงกรวย ทรงกระบอก ทรงกลม เป็นต้น (เกษมและคณะ, 2552)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) และสปอร์แบบสายโซ่สั้น (short chain)

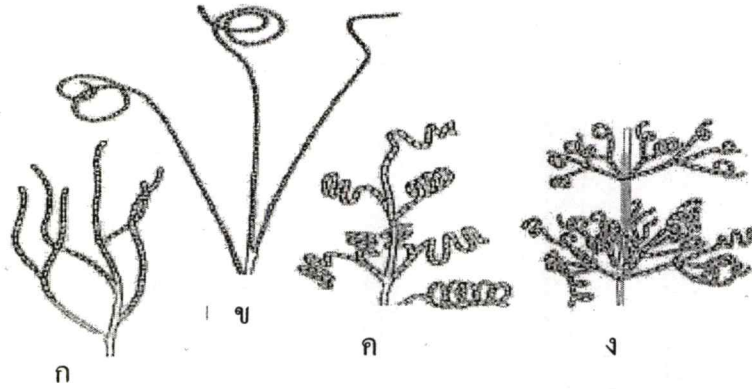
Monosporous ก : *Micromonospora* ข : *Thermomonospora*

ค : *Saccharomonospora*

Bisporous ง : *Microbispora*

Oligosporous จ : *Nocardia brevicatina* ฉ : *Catellatospora*

ที่มา : Vobis (1997)



รูปที่ 2.6 ลักษณะของสปอร์สายโซ่ยาว (long chain) ของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)

ก : ลักษณะสปอร์เป็นสายตรง

ข : ลักษณะสปอร์เป็นสายคล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดเป็นเกลียวซ้อนทับกัน 1-3 ชั้น

ค : ลักษณะสายสปอร์เป็นเกลียว แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ เป็นเกลียววงปิด และเป็นเกลียววงเปิด เกลียวยาว และไม่ติดกันแน่น

ง : ลักษณะสายสปอร์ขดเป็นเกลียวคล้ายกันหอย และแตกแขนงออกเป็นข้อ

ที่มา : Vobis (1997)

2.2 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท

การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถจัดจำแนกตามลักษณะต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้

2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีความจำเป็นสำหรับการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทอย่างมาก เช่น ลักษณะการสร้างเส้นใยในการเจริญในอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ต่างๆ โดยคุณลักษณะเส้นใย เช่น เส้นใยอากาศ การเกิดกระบวนการแตกกิ่งก้านของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร คุณลักษณะการสร้างสปอร์โดยคุณลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นว่าเป็นแบบเดี่ยวๆ เป็นสายยาวหรือสายสั้นๆ ตลอดถึงจำนวนของสปอร์ต่อสายบนก้านชูสปอร์ รวมถึงคุณลักษณะรูปร่างของเส้นใย และรูปร่างและขนาดของสปอร์แรงเจียม รวมถึงคุณจำนวนสปอร์แรงจิโอสปอร์ต่อสปอร์แรงเจียม

2.2.2 ลักษณะการเจริญบนอาหาร

คุณลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ต่างๆ yeast malt agar medium (ISP medium no.2) oatmeal agar medium (ISP medium no.3) Starch inorganic salt agar medium (ISP medium no.4) เป็นต้น โดยคุณลักษณะสีของเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร รวมถึงการสร้างเม็ดสีที่ละลายในอาหาร

2.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

1. คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบ คือ

1.1 Coagulation เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้จะเห็นได้จากอาหารมีการรวมกลุ่มหรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

1.2 Peptonization หากมีการย่อยโปรตีนขึ้นลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

2. คุณสมบัติในการรีดิวซ์ไนเตรท (reduction of nitrate) การสลายตัวของไนเตรทเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถทดสอบได้โดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟาเนฟทิลลามีน (α -naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิกและไนเตรท จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) จะรวมตัวกับเนฟทิลลามีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye)

3. คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Hydrolysis of starch) เป็นความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) 2 ชนิด คืออะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) โดยในอะไมโลส (amylose) มีองค์ประกอบของ D-glucose จะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4- α -glucosidic ส่วนอะไมโลเพคติน (amylopectin) มีองค์ประกอบของ D-glucose จะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4- α -glucosidic และพันธะ 1,6- α -glucosidic (ดวงพร, 2537) การทดสอบแป้งดูได้จากบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Clear zone) ภายใต้อาหารและรอบๆ วัดการเจริญจากการย่อยแป้ง

4. คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง เชื้อบางชนิดมีความทนกรด-ด่างไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงนำมาใช้จัดจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น

5. ความสามารถในการทนเกลือ สามารถบอกถึงคุณสมบัติการเจริญในสภาวะที่มีระดับเกลือต่างๆ รวมทั้งบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆ ด้วย

6. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้ 3 พวก คือ พวกที่เจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) พวกที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) และ พวกที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) (ดวงพร, 2537) ดังนั้นจึงใช้ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันนี้ช่วยในการจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีท

2.2.4 ลักษณะการจำแนกทางเคมี

นอกจากจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจัดจำแนก เช่น ชนิดไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (diaminopimelic acid, DAP)

ที่ผนังเซลล์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ฟอสโฟลิปิดโพลาร์ลิปิด (polar lipid) กรดไขมันไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็นสมบัติที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพื่อการจัดจำแนกในระดับสกุลองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่นำมาพิจารณาได้แก่

1. ชนิดของของกรดไดอะมิโนพิมลิกของผนังเซลล์ (2,6-diaminopimelic acid :DAP) เป็นกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น ไมโคพลาสมา (mycoplasma) และอาร์เคแบคทีเรีย (archaeobacteria) จะมีเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์โดยประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน โมโนเมอร์ (peptidoglycan monomer) ที่สร้างขึ้นจากการเชื่อมต่อกันของอะมิโน ซูการ์ (amino sugar) 2 ชนิด คือ N-acetylglucosamine (NAG) และเอ็น-อะซิติลมารามิก (N-acetylmuramic acid, NAM) ที่เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโน 4 ชนิดเช่น ดีเอพี (DAP) อะลานีน (alanine) ไกลซีน (glycine) ไลซีน (lysine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นต้น ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีท์ส่วนใหญ่ยังมีการเชื่อมข้ามสายระหว่างดีเอพี (DAP) กับอะลานีน (alanine) หรือระหว่างไลซีน (lysine) กับอะลานีน (alanine) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของแอคติโนมัยซีท์อาจมีดีเอพี (DAP) เป็นแบบ LL-isomer meso-isomer และ OH-isomer หรือไม่มีก็ได้ จึงสามารถใช้ชนิดของดีเอพี (DAP) ในการจัดจำแนกในระดับสกุลได้ (Lechevalier และคณะ, 1970) และดูได้จาก การแสดงองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แอคติโนมัยซีท์แต่ละชนิด (Lechevalier และ Lechevalier, 1970)

2. ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) กาแลกโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) โรโบส (ribose) มาดูโรส (madurose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น นอกเหนือจากกลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมารามิก (muramic acid) ของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) รูปแบบของน้ำตาลสามารถแบ่งแอคติโนมัยซีท์ที่มีดีเอพี (DAP) เป็นแบบ meso-isomer ออกเป็น 4 ประเภทคือ ชนิดเอ (Type A) มีน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) และกาแลกโตส (galactose) แต่ไม่มีไซโลส (xylose) ชนิดบี (Type B) มีน้ำตาลมาดูโรส (madurose) แต่ไม่มีอะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) ชนิดซี (Type C) ไม่สามารถระบุรูปแบบน้ำตาลที่เฉพาะได้และชนิดดี (Type D) มีน้ำตาลไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose) เป็นองค์ประกอบ (Lechevalier และคณะ, 1970)

3. ลักษณะของโพลาร์ลิปิด (polar lipid) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ ฟอสโฟลิปิดแสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ใน โมเลกุล (Komagato และ Suzuki, 1987)

4. ลักษณะของไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) ไอโซพรีนอยด์ควิโนนมีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ชนิดของไอโซพรีนอยด์ควิโนนแบ่งเป็นเมนาควิโนนและไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนน แบคทีเรียบางชนิดพบแนฟโทควิโนน (naphthoquinones) นอกจากนี้จำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene) และระดับของการเกิดไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในสายของไอโซพรีนิล (isoprenyl) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งมักจะใช้ high-performance liquid chromatography (HPLC) และ reverse-phase thin layer chromatography ในการวิเคราะห์ (Komagata และ Suzuki, 1987)

5. กรดมัคคอลลิก (Mycolic acid) กรดมัคคอลลิกประกอบด้วยคาร์บอน 70 ถึง 90 อะตอม ใน 1 กิ่งจะประกอบด้วย 24 คาร์บอน ในสายโซ่แต่ละสายมีตำแหน่งซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จัดจำแนกลักษณะของกรดมัคคอลลิก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีกรดมัคคอลลิกเป็นองค์ประกอบพบว่ามีกรดมัคคอลลิกหลายชนิด เช่น ไกลโคลิพิด (glycolipids) ฟีนอลิกไกลโคลิพิด (phenolic glycolipids) หรือไกลโคเปปติโดลิพิด (glycopeptidolipids) (Liu และคณะ, 1996)

2.2.5 ลักษณะทางจีโนมไทป์

เป็นการศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา การศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอมักลำดับเบสของยีนในช่วงต่างๆ ยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซมซึ่งไรโบโซมเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) เป็นช่วงยีนบนสายดีเอ็นเอที่นำมาใช้เนื่องจากมีข้อดีหลายประการคือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิดเปรียบเสมือนยีนลายเซ็น (signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิดซึ่งในส่วนที่เหมือนกันนี้นำมาใช้เป็นไพรเมอร์ (primer)

ช่วงที่เหมือนกันนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ (PCR amplification) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) คือไพรเมอร์นี้สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวนยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ได้จากแบคทีเรียทุกชนิด

ส่วนในช่วงของยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสกุลและสปีชีส์ได้โดยนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อดูความคล้ายคลึงกันและสร้างสาย phylogenetic tree ซึ่งสามารถบอกสายวิวัฒนาการได้ (ไพร์ตัน, 2551)

2.3 อนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

Stackebrandt และคณะ (1997) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และลักษณะทางจีโนมไทป์ในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอกติโนแบคทีเรียโดยจำแนกได้เป็น 5 คลาสย่อย 5 อันดับ 10 อันดับย่อย 30 วงศ์ และ 95 สกุล และในปี 2009 Zhi และคณะ ได้ปรับระบบการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทให้เป็นปัจจุบัน ดังรูปที่ 2.7

Class *Actinobacteria*

Subclass <i>Acidimicrobidae</i>	Order <i>Acidimicrobiales</i>	Family <i>Acidimicrobiaceae</i>
Subclass <i>Rubrobacteridae</i>	Order <i>Rubrobacteriales</i>	Family <i>Rubrobacteriaceae</i>
Subclass <i>Coriobacteridae</i>	Order <i>Coriobacteriales</i>	Family <i>Coriobacteriaceae</i>
Subclass <i>Sphaerobacteridae</i>	Order <i>Sphaerobacteriales</i>	Family <i>Sphaerobacteriaceae</i>
Subclass <i>Actionobacteridae</i>	Order <i>Actionomycetales</i>	
Suborder	Suborder	Suborder
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Corynebacterineae</i>
Family <i>Actinomycetaceae</i>	Family <i>Micrococcaceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Yaniellaceae</i>	Family <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Segniliparaceae</i>

รูปที่ 2.7 อนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอกติโนแบคทีเรีย

Suborder

Micromonosporineae

Family

Micromonosporaceae

Suborder

Propionibacterineae

Family

Propionibacteriaceae

Nocardiodaceae

Suborder

Pseudonocardineae

Family

Pseudonocardiaceae

Actinosynnemataceae

Suborder

Streptomycineae

Family

Streptomycetaceae

Suborder

Streptosporangineae

Family

Streptosporangiaceae

Nocardiopsaceae

Thermomonosporaceae

Suborder

Frankineae

Family

Frankiaceae

Acidothermaceae

Geodermatophilaceae

Sporichthyaceae

Cryptosporangiaceae

Nakamurellaceae

Suborder

Glycomycineae

Family

Glycomycetaceae

Suborder

Actinopolysporineae

Family

Actinopolysporaceae

Suborder

Catenulisporineae

Family

Catenulisporaceae

Actinospicaceae

Suborder

Kineosporiineae

Family

Kineosporiaceae

Subclass *Actionobacteridae*

Order *Bifidobacteriales*

Family *Bifidobacteriaceae*

รูปที่ 2.7 อนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอกติโนแบคทีเรีย (ต่อ)

เชื้อแอกติโนมัยซีทอยู่ในคลาสย่อยแอกติโนแบคทีริเด (subclass *Actinobacteridae*) อันดับแอกติโนมัยซีตาเลส (order *Actinomycetales*) ซึ่งประกอบด้วย 13 อันดับย่อย (suborder) คือ

1. อันดับย่อยแอกติโนมัยซีนีอี (suborder *Actinomycineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234 (R-U) 598:640 (Y-G) 828 (R) 829:857 (G-C) 832:854 (G-Y) 952:1229 (C-G) และ 986:1219 (A-U) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ วงศ์แอกติโนมัยซีตาซีอี (family *Actinomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Actinomyces Mobiluncus* และ *Arcanobacterium*

2. อันดับย่อยไมโครคอคคินีอี (suborder *Micrococccineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234 (A-U) 598:640 (U-G) 657:749 (U-A) 953:1228 (G-C) 986:1219 (A-U) 987:1218 (A-U) และ 1362 (A) ประกอบด้วย 15 วงศ์ คือ

2.1 วงศ์ไมโครคอคคาซีอี (family *Micrococcaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 9 สกุล ได้แก่ *Micrococcus Acaricomus Arthrobacter Citricoccus Kocuria Nesterenkonia Renibacterium Rothia* และ *Zhihengliuella*

2.2 วงศ์เซลลูโลโมนาดาซีอี (family *Cellulomonadaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Oerskovia Cellulomonas Actinotalea Demequina* และ *Tropheryma*

2.3 วงศ์โพรไมโครโมโนสปอราซีอี (family *Promicromonosporaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 6 สกุล ได้แก่ *Promicromonospora Cellulosimicrobium Myceligenerans Xylanibacterium Xylanimicrobium* และ *Xylanimonas*

2.4 วงศ์เดอร์มาโตฟิลาซีอี (family *Dermatophilaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุล ได้แก่ *Dermatophilus* และ *Xylanimonas*

2.5 วงศ์เบรวิแบคทีเรียซีอี (family *Brevibacteriaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Brevibacterium*

2.6 วงศ์เดอมาแบคทีราซีอี (family *Dermabacteraceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุล ได้แก่ *Dermabacter* และ *Brachybacterium*

2.7 วงศ์อินทราสปอแรงเจียซีอี (family *Intrasporangiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 16 สกุล ได้แก่ *Intrasporangium Arsenicococcus Humihabitans Janibacter Knoellia Kribbia Lapillicoccus Marihabitans Ornithinicoccus Ornithinimicrobium Oryzihumus Phyciococcus Serinicoccus Terracoccus Tetrasphaera* และ *Terrabacter*

2.8 วงศ์โจเนสเซียซีอี (family *Jonesiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Jonesia*

2.9 วงศ์ไมโครแบคทีเรียซีอี (family *Microbacteriaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 25 สกุล ได้แก่ *Agreia Agrococcus Agromyces Clavibacter Cryobacterium Curtobacterium Frigorium*

Fronidhabitans Glaciibacter Klugiella Labedella Leifsonia Leucobacter Microbacterium Microcella Microterricola Mycetocola Okibacterium Plantibacter Phycicola Pseudoclavibacter Rathayibacter Salinibacter Salinibacterium และ *Yonghaparkia*

2.10 วงศ์บิวเทนเบอเกียซีอี (family *Beutenbergiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Beutenbergia* *Georgenia* และ *Salana*

2.11 วงศ์โบโกเรลลาซีอี (family *Bogoriellaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Bogoriella*

2.12 วงศ์เดอมาคอคคาซีอี (family *Dermacoccaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Dermacoccus* *Demetria* และ *Kytococcus*

2.13 วงศ์ราโบแบคเทอราซีอี (family *Rarobacteraceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Rarobacter*

2.14 วงศ์แซงกีแบคเทอราซีอี (family *Sanguibacteraceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Sanguibacter*

2.15 วงศ์ยานัลลาซีอี (family *Yaniellaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Yaniella*

3. อันดับย่อยโครีเนแบคทีรีนีส (suborder *Corynebacterineae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์ คือ

3.1 วงศ์โครีเนแบคทีเรียซีอี (family *Corynebacteriaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 250 (U) 316:337 (U-G) 418:425 (C-G) 586:755 (U-G) 599:639 (C-G) 662:734 (U-G) 987:1218 (G-C) และ 1059:1198 (U-A) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุล ได้แก่ *Corynebacterium* และ *Turicella*

3.2 วงศ์มัคโคแบคทีเรียซีอี (family *Mycobacteriaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C) 250 (U) 316:337 (C-G) 418:425 (C-G) 586:755 (U-G) 599:639 (U-G) 662:734 (C-G) 987:1218 (G-C) 1000:1040 (A-U) และ 1026:1035 (U-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Mycobacterium*

3.3 วงศ์นอคาร์เดียซีอี (family *Nocardiaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 250 (U) 316:337 (C-G) 418:425 (C-G) 580:761 (U-A) 599:639 (C-G) 662:734 (C-G) 987:1218 (G-C) และ 1000:1040 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Nocardia* *Rhodococcus* *Gordonia* *Millisia* และ *Williamsia*

3.4 วงศ์ซึกามูเรลลาซีอี (family *Tsakamurellaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่

ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C) 250 (U) 316:337 (C-G) 418:425 (C-G) 570:761 (C-A) 599:639 (C-G) 987:1218 (G-C) 1000:1040 (A-C) และ 1059:1198 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Tsukamurella*

3.5 วงศ์ไดเอทเซียซีอี (family *Dietziaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 241:285 (U-G) 250 (U) 316:337 (C-G) 418: 425 (U-A) 599:639 (C-G) 662:734 (C-G) 987:1218 (A-U) 1000:1040 (A-U) 1059:1198 (U-A) และ 1115:185 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Dietzia*

3.6 วงศ์เซกนิลิปาราซีอี (family *Segniliparaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C) 250 (A) 316:337 (C-G) 418: 425 (C-G) 586:755 (C-G) 599:639 (C-G) 662:734 (C-G) 987:1218 (G-C) 1000:1040 (A-G) และ 1059:1198 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Segniliparus*

4. อันดับย่อยไมโครโมโนสปอริเนีย (suborder *Micromonosporineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ตำแหน่งที่ 127:234 (A-U) 209 (G) 536 (G) 831:855 (U-G) 832:854 (G-Y) 833:853 (U-G) 840:846 (Y-G) 845 (G) 955:1225 (A-U) 986:1219 (U-A) และ 987:1218 (G-C) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ วงศ์ไมโครโมโนสปอราซีอี (family *Micromonosporaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 17 สกุล ได้แก่ *Micromonospora Actinocatenispora Actinoplanes Asanoa Catellatospora Couchioplanes Catenuloplanes Dactylosporangium Longispora Pilimelia Polymorphospora Planosporangium Pseudosporangium Salinispora Spirilliplanes Verrucosispora* และ *Virgisporangium*

5. อันดับย่อยโพรไพโอนิแบคทีรีเนีย (suborder *Propionibacterineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

5.1 วงศ์โพรไพโอนิแบคทีเรียซีอี (family *Propinibacteriaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 328 (U) 407:435 (C-G) 451 (A) 453 (G) 819 (G) 825:875 (A-U) 827 (C) 828 (U) 832:854 (U-C) 833:853 (G-U) และ 844 (U) เชื้อในวงศ์นี้มี 12 สกุล ได้แก่ *Aestuariimicrobium Friedmanniella Granulicoccus Propionibacterium Luteococcus Micropruina Propionicicella Propionicimonas Propioniferax Propionimicrobium* และ *Tessaracoccus*

5.2 วงศ์นอคาร์ดิอิดิคาเซีย (family *Nocardioideae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 328 (C) 407:435 (A-U) 451 (G) 453 (C) 819 (U) 825:875 (G-C) 827 (U) 828 (A) 832:854 (G-G) 833:853 (U-C) และ 844 (C) เชื้อในวงศ์นี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Nocardioides* *Actinopolymorpha* *Aeromicrobium* *Kribbella* และ *Marmoricola*

6.อันดับย่อยชูโดนอคาร์ดินีอี (suborder *Pseudonocardineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

6.1 วงศ์ชูโดนอคาร์เดียซีอี (family *Pseudonocardiaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 211 (G) 480 (U) และ 142:221 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 12 สกุล ได้แก่ *Actinoalloteichus* *Actinomycetospora* *Amycolatopsis* *Crossiella* *Kibdelosporangium* *Kutzneria* *Goodfellowiella* *Prauserella* *Pseudonocardia* *Saccharomonospora* *Saccharopolyspora* และ *Thermocrispum*

6.2 วงศ์แอคตินอซินนีมาตาซีอี (family *Actinosynnemataceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 211 (A) 480 (G) และ 142:221 (C-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 6 สกุล ได้แก่ *Actinosynnema* *Actinokineospora* *Lechevalieria* *Lentzea* *Saccharothrix* และ *Umezawae*

7.อันดับย่อยสเตรปโตมัซินีอี (suborder *Streptomycineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ตำแหน่งที่ 127:234 (G-C) 449 (A) 672:734 (C-G) 950:1231 (U-G) 952:1229 (U-A) 955:1225 (C-G) 965 (C) 986:1219 (A-U) และ 1362 (C) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ สเตรปโตมัซิดาซีอี (family *Streptomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*

8.อันดับย่อยสเตรปโตสปอแรงจินีอี (suborder *Streptosporangineae*) ประกอบด้วย 3 วงศ์ คือ

8.1 วงศ์สเตรปโตสปอแรงเจียซีอี (family *Streptosporangineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 440:497 (C-G) 485 (U) 501:544 (C-G) 5502:543 (G-C) 833:853 (U-G) และ 1355:1367 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 10 สกุล ได้แก่ *Acrocarpospora* *Streptosporangium* *Herbidospora* *Microbispora* *Microtetraspora* *Planobisspora* *Planomonospora* *Nonomuraea* *Planotetraspora* และ *Thermopolyspora*

8.2 วงศ์นอคาร์ดิอิดิคาเซียซีอี (family *Nocardiopsaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 440:497 (U-U) 485 (G) 501:544 (G-C) 502:543 (A-U) 833:853 (U-G) และ

1355:1367 (G-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 4 สกุล ได้แก่ *Nocardiopsis* *Haloactinospora* *Streptomonospora* และ *Thermobifida*

8.3 วงศ์เทอร์โมโมนอสพอราซีอี (family *Thermomonosporaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 440:497 (C-G) 501:544 (C-G) 502:543 (G-C) 831:855 (U-G) 843 (U) 844 (A) และ 1355:1367 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 4 สกุล ได้แก่ *Thermomonospora* *Actinocorallia* *Actinomadura* และ *Spirillospora*

9. อันดับย่อยแฟรนคีนีอี (suborder *Frankiaceae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์ คือ

9.1 วงศ์แฟรนเคียซีอี (family *Frankiaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 184:193 (A-C) 195 (A) 196 (U) 582:758 (U-A) 601:637 (G-U) 602:636 (C-G) 841 (C) 952:1229 (U-A) 986:1219 (A-U) 1059:1198 (C-G) และ 1308:1329 (C-G) เชื้อในวงศ์มี 1 สกุล ได้แก่ *Frankia*

9.2 วงศ์จีโอเดอร์มาโตฟิลาซีอี (family *Geodermatophilaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 157:164 (A-U) 158:163 (A-U) 184:193 (A-C) 195 (C) 196 (A) 293:304 (R-U) 601:637 (G-U) 602:636 (C-G) 841 (A) 952:1228 (U-A) 986:1219 (U-A) 1059:1198 (U-A) และ 1027:1034 (C-G) เชื้อในวงศ์มี 3 สกุล ได้แก่ *Geodermatophilus* *Blastococcus* และ *Modestobacter*

9.3 วงศ์สปอริชยาซีอี (family *Sporichthyaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 184:193 (A-G) 195 (C) 196 (A) 416:427 (G-C) 600:638 (U-G) 602:636 (C-G) 612:638 (U-A) 841 (U) 952:1229 (U-A) 986:1219 (A-U) 1042 (A) และ 1059:1198 (U-A) เชื้อในวงศ์มี 1 สกุล ได้แก่ *Sporichthya*

9.4 วงศ์ซิโดเทอร์มาซีอี (family *Acidothermaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 184:193 (C-U) 195 (G) 196 (C) 203:214 (U-G) 589:650 (U-A) 601:637 (G-U) 602:636 (A-U) 614:626 (A-U) 841 (U) 952:1229 (U-A) 986:1219 (U-A) 1059:1198 (C-G) และ 1308:1329 (C-G) เชื้อในวงศ์มี 1 สกุล ได้แก่ *Acidothermus*

9.5 วงศ์คริปโตสปอแรงเจียซีอี (family *Cryptosporangiaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 195 (U) 196 (C) 601:637 (A-U) 602:636 (C-G) 841 (U) 952:1229 (C-G)

986:1219 (A-U)1042 (U) 1059:1198 (U-A) 1251 (G) และ 1003:1037 (A-C) เชื้อในวงศ์มี 1 สกุล ได้แก่ *Cryptosporangium*

9.6 วงศ์นากามูเรลาซีอี (family *Nakamurellaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 184:193 (A-C) 195 (C) 196 (A) 489:650 (U-A) 601:637 (A-U) 602:636 (A-U) 670:736 (U-A) 841 (C) 952:1229 (C-G) 986:1219 (A-U) 1059:1198 (U-A) 1120:1153 (U-A) และ 1027:1034 (C-G) เชื้อในวงศ์มี 3 สกุล ได้แก่ *Nakamurella Humicoccus* และ *Saxeibacter*

10.อันดับย่อยไกลโคมีซินีอี (suborder *Glycomycineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ตำแหน่งที่ 657:749 (G-U) 672:734 (C-G) 681:709 (A-U) 831:855 (U-G) 832:854 (G-U) 833:853 (G-C) 840:846 (C-U) 952:1229 (C-G) 1064:1192 (G-G) และ 1117:1183 (A-U) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ วงศ์ไกลโคมีซิตาซีอี (family *Glycomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Glycomyces*

11.อันดับย่อยแอกติโนโพลีสปอริเนียอี (suborder *Actinopolysporineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ตำแหน่งที่ 127:234 (A-U) 242:284 (C-G) 657:749 (G-C) 672:734 (C-G) 828 (A) 829:857 (G-C) 833:853 (U-G) 840:846 (C-G) 986:1219 (U-A) 1100 (U) 1183 (C) 1117:1183 (G-C) และ 1309:1328 (G-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Actinopolyspora*

12.อันดับย่อยคาเทนูลิสปอริเนียอี (suborder *Catenulisporineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

12.1 วงศ์คาเทนูลิสปอราซีอี (family *Catenulisporaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 262 (A) 344 (A) 576 (A) 747 (A) 129:232 (U-A) 580:761 (U-A) 658:748 (U-U) 659:746 (C-G) 824:876 (A-U) 825:875 (A-U) 834:852 (G-G) 952:1229 (U-A) 986:1219 (U-A) และ 999:1041 (U-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Catenulispora*

12.2 วงศ์แอกติโนสปิคาซีอี (family *Actinospicaceae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของวงศ์นี้อยู่ตำแหน่งที่ 262 (G) 344 (G) 576 (G) 747 (U) 129:232 (A-G) 580:761 (C-G) 576:755 (C-G) 658:748 (A-U) 659:746 (U-A) 824:876 (C-G) 825:875 (G-C) 834:852 (G-C) 952:1229 (C-G) 986:1219 (A-U) และ 999:1041 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Actinospica*

13.อันดับย่อยไคนีโอสปอริอีนีอี (suborder *Kineosporiineae*) รูปแบบของตำแหน่งจำเพาะของนิวคลีโอไทด์ของสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA signatures nucleotide) ของอันดับย่อยนี้อยู่ตำแหน่งที่ 127:234 (A-U) 142:221 (C-U) 598:640 (U-G) 840:846 (A-C) 845 (A) 986:1218 (A-U) 1163:1173 (G-U) 1164:1172 (G-C) และ 1165:1171 (G-A) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ วงศ์ไคนี

โอสปอเรียซีอี (family *Kineosporiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Kineosporia* *Kineococcus* และ *Quadrisphaera*

2.4 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

บทบาทของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สำคัญส่วนใหญ่จะเกิดจากเชื้อสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากก็ยังคงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสามารถหลากหลาย

2.4.1 ด้านสิ่งแวดล้อมและนิเวศวิทยา สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารประกอบที่ซับซ้อนในเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ ในดินที่มีสารประกอบเชิงเดี่ยวของอินทรีย์สารต่างๆ และมีพีเอชเป็นกลางพบแอคติโนมัยสีทน้อยมาก เนื่องจากไม่สามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ แต่ถ้าในดินที่มีสารประกอบอินทรีย์ที่ซับซ้อนและย่อยสลายได้ยาก จะพบแอคติโนมัยสีทเจริญอย่างรวดเร็ว เนื่องจากย่อยสลายสารเหล่านี้ได้ดีกว่าฟังไจและแบคทีเรียเป็นการช่วยสร้างฮิวมัสในดินทำให้สารเหล่านี้เปลี่ยนเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้นอกจากนี้ยังช่วยในการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบต่าง ๆ ในที่มีอุณหภูมิสูง เช่น การหมักอินทรีย์วัตถุเพื่อทำปุ๋ยคอก

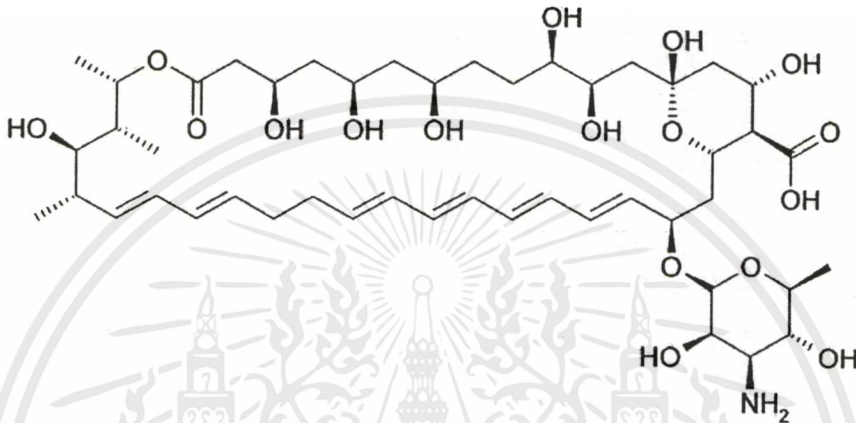
2.4.2 ด้านเกษตรกรรม สามารถช่วยในการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบต่าง ๆ ในที่มีอุณหภูมิสูง เช่น การหมักอินทรีย์วัตถุเพื่อทำปุ๋ยคอกและช่วยในการควบคุมศัตรูพืชได้ เช่น ผลิตสารเพื่อใช้เป็นยาฆ่าแมลง ได้แก่ phosphinothricin เป็นต้นช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในดิน โดยสร้างยาปฏิชีวนะและเอนไซม์ทำลายแบคทีเรียและฟังไจในดินได้

2.4.3 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส เป็นต้น โดยสามารถสร้างสารแอนติไบโอติกได้มากถึง 2 ใน 3 ของสารแอนติไบโอติกทั้งหมดที่เรารู้จักกัน นอกจากนี้สามารถนำมาผลิตยาต่างๆ เช่น สารที่มีสมบัติต้านเชื้อรา ได้แก่ นิสตาติน (nystatin) โพลีออกซิน (polyoxin) และ แอนทราซัยคลิน (anthracycline) เป็นต้น

2.5 การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) หมายถึง สารที่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เรียกว่าจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยสีท ที่สามารถผลิตสารนี้ขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ แล้วมีอำนาจยับยั้งหรือทำลายชีวิตของจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ซึ่งเป็นลักษณะของการรักษาสมดุลในระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ดังนั้นยาปฏิชีวนะเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มยาต้านจุลชีพที่แยกได้จากจุลชีพนั่นเอง ปัจจุบันจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย

สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่ไม่มีคามจำเป็นต่อการเจริญ แต่ถ้ามีอาจก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิตส่วนใหญ่จะสร้างในช่วงท้าย log phase จนถึงช่วง stationary phase เป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญคงที่ สารปฏิชีวนะที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้ก่อให้เกิดการยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้

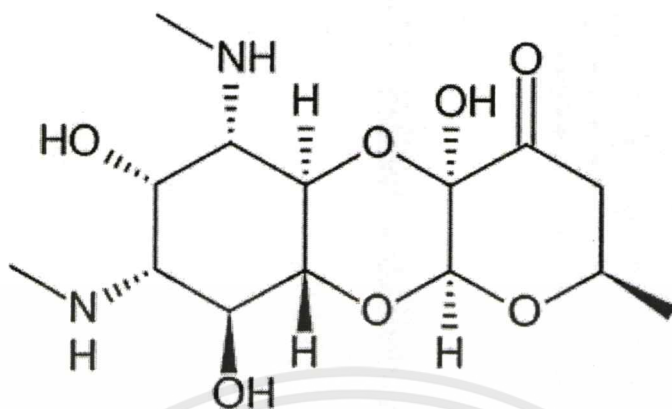


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของนิสตาติน (nystatin)

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nystatin.png> (28/11/54)

แอกติโนมัยซีทเป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่มใหญ่ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จำนวนมาก และพบว่าสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) เป็นกลุ่มสกุลที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จำนวนมาก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งต่อการนำมาศึกษาหาสารปฏิชีวนะ (Okami และ Hotta, 1988) การสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของแอกติโนมัยซีท พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทมีการสร้างสารปฏิชีวนะในช่วง idiophase ของการเจริญ สารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ มักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็นวงศ์ (family) หรือกลุ่ม (series) ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบบะ (bath culture) โดยเฉพาะเชื้อในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture ลงในอาหารในระยะแรกเชื่อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื่อจะมีเมตาบอลิซึมและอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารที่ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical inter บางชนิด ทำให้อัตราการ

เจริญญกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ เป็นสารปฏิชีวนะออกมา



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสเปคตินโนมายซิน (spectinomycin)

ที่มา : <http://www.antibioticslist.com/> (28/11/54)

2.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

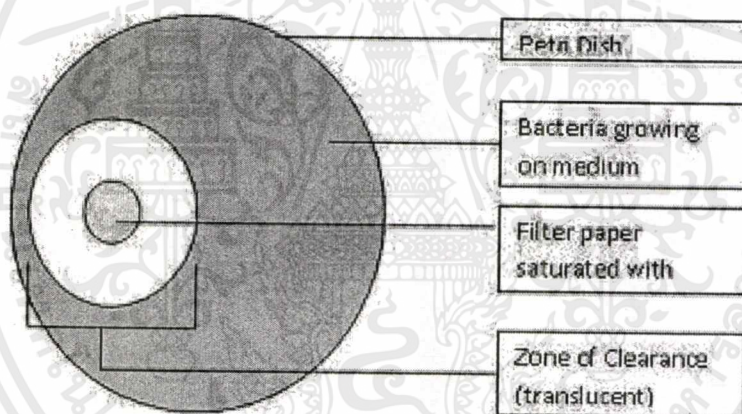
การทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่องซึ่งให้ความสำคัญต่อการคิดค้นและพัฒนาเป็นอย่างมากเพื่อให้ได้ยาปฏิชีวนะที่มีคุณภาพดีและมีฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มมากขึ้น โดยการค้นพบนี้มุ่งเน้นทางด้านวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกและการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีตสกุลสเตรปโตไมซีต (*Streptomyces*) และสกุลอื่นๆมากขึ้นทั้งนี้ในดินก็ยังพบแอกติโนมัยซีตในสกุลอื่น โดยเฉพาะสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ซึ่งนำมาผลิตเป็นสารปฏิชีวนะได้ แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตก็น้อยกว่าสกุลสเตรปโตไมซีต (*Streptomyces*) อยู่มาก (Nonomura และ Ohara, 1969)

การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (Primary screening test) โดยการฉีดเชื้อเป็นเส้นตรงแนวตั้งบนอาหาร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นลากเส้นจุลินทรีย์ทดสอบในแนวขวางตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอกติโนมัยซีต แต่ไม่ให้สัมผัสกัน การตรวจสอบผลจะดูจากระยะทางการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยจุลินทรีย์ทดสอบที่นำมาศึกษานั้นควรครอบคลุมทั้งกลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา (Boudjella และคณะ, 2006)

การตรวจสอบความไวของสารปฏิชีวนะอีกวิธีหนึ่งคือจะต้องเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีตในอาหาร ISP2 ชนิดเหลว ให้เชื้อเจริญในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน จากนั้นคัดกรองเซลล์ออกจากราน้ำหมักแล้วจึงนำน้ำหมักมาทดสอบฤทธิ์ โดยวิธีแผ่นทดสอบฤทธิ์ (Paperdisc) วิธีนี้จะอาศัยหลักการแพร่ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้อาหารวุ้นผสมเชื้อทดสอบลงไปในงานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งจากนั้นเจาะรูอาหารวุ้นเป็นรูปทรงกระบอก แล้วใส่น้ำหมักที่ต้องการวิเคราะห์ลง

ไป สารที่ต้องการวิเคราะห์จะแพร่ออกไปตามแนวรัศมีรอบๆบริเวณที่เจาะรู ทำให้ยับยั้งเชื้อหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (งามนิจ, 2537) เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสหรือบริเวณการเจริญ (Growth zone) ของเชื้อทดสอบจะแปรตามปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (สมใจ, 2545)

อีกวิธีหนึ่งคือการใช้แผ่นทดสอบฤทธิ์วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ทำกรทา (Swab) เชื้อไว้แล้ว ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นแล้วจึงคีบแผ่นทดสอบที่ชุบสารปฏิชีวนะแต่ละชนิด ไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานที่เชื้อไว้ โดยให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 15 มิลลิเมตร แต่ละแผ่นห่างกันไม่ต่ำกว่า 20 มิลลิเมตร โดยในแต่ละจานให้วางแผ่นทดสอบเพียงจานละ 5 แผ่น และทำให้แบนราบติดสนิทกับผิวหน้าอาหาร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การอ่านผลจะวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดจากสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดเป็นมิลลิเมตร โดยวัดคร่อมแผ่นทดสอบ 2 ครั้ง ทั้งแนวตั้งและแนวนอน แล้วหาค่าเฉลี่ย (งามนิจ, 2537)



รูปที่ 2.10 ลักษณะการวางแผ่นทดสอบ (disc) ในการทำ disc diffusion

ที่มา : <http://www.odec.ca/projects/2007/luar7a2/> (1710/2554)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Thakur และคณะ (2007) ได้มีการวิจัยในหัวข้อการแยกจากเชื้อสเตรปโตมัยเซสในดินของพื้นที่ป่าคุ้มครอง จากประเทศอินเดีย สำหรับการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษานี้พบสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) 110 สายพันธุ์ ถูกคัดแยกกับอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วงของสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราพบว่าในร้อยละ 30 ของสายพันธุ์ มีแนวโน้มว่าจะยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ายับยั้งแบคทีเรีย 65 สายพันธุ์ (ร้อยละ 49.09) และยับยั้งเชื้อรา 45 สายพันธุ์ (ร้อยละ 42.72) จากการศึกษาในอดีตแสดงให้เห็นว่าอัตราการคัดแยกของแอกติโนมัยสีทมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญสูงกว่าร้อยละ 40 และในอื่น ๆ

น้อยกว่าร้อยละ 10 ในพื้นที่คุ้มครองนี้มีดินอุดมสมบูรณ์มากซึ่งเป็นเงื่อนไขที่ดีเยี่ยมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีท

Valan และคณะ (2009) ได้มีการวิจัยถึงฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในหลอดทดลองของเชื้อสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ที่คัดแยกได้เป็นอีอาร์ไอ-สาม (ERI - 3) จากดินที่เทือกเขากัสท์ประเทศอินเดีย ผลทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกจากดินของเทือกเขากัสท์ รัฐมิพนาฑู ประเทศอินเดียอินเดีย พบว่าเป็น สเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ชนิดของดินเป็นสีดำและสีลาแดง อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 22 ถึง 26 องศาเซลเซียส เป็นป่าที่ประกอบด้วยยาง (*Hevea brasiliensis*) พริกไทย (*Piper longum*) กานพลู (*Syzygium caryophyllatum*) และอารียาม (Areca - Nut) เชื้อที่แยกได้เป็นพวกต้องการอากาศ (Aerobic) และ แกรมบวก มีการเจริญของเส้นใยในอากาศจะมีสปอร์แรงเจียม (sporangium) เป็นพวกชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) และมีเอนไซม์คาตาเลส (catalase enzyme) ในการคัดแยกเบื้องต้น (Cross streak) ได้ผลว่ายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ปานกลาง

Arifuzzaman และคณะ (2010) แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่ Karanjai ใน Sundarbans ทั้งหมด 55 ไอโซเลต มีลักษณะเฉพาะสำหรับการจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยา โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *Actinomyces* 27 ไอโซเลต *Nocardia* 14 ไอโซเลต *Streptomyces* 11 ไอโซเลตและ *Micromonospora* 3 ไอโซเลต สามารถผลิตยาปฏิชีวนะต้านต่อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นเชื้อก่อโรค เช่น *Shigella boydii* *Shigella flexneri*-AN-31153 *Shigella sonnei* *Pseudomonas Shigella dysenteriae* type-1 *Vibrio cholerae*-0139 *Salmonella typhi*-Ao-12014 *Plesiomonas Hafnia* spp. *Vibrio cholerae*-OGET และ *Escherichia coli*-186LT การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินจาก Sundarbans มีแอคติโนมัยซีทที่มีความหลากหลาย การทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่าไอโซเลตที่นำมาทดสอบสามารถต้านต่อจุลินทรีย์ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นแหล่งที่มาของยาปฏิชีวนะที่น่าสนใจได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE600 บริษัท Memmert, Germany
2. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) HI RAYAMA รุ่น KI CLAVE, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Olympus, Japan
4. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น UV-126 International Scientific Supply, Thailand
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius, Germany
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) EUTECH INSTRUMENT P4510, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) HERMLE Labotechnik รุ่น 36HK, Germany
8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany
9. ตู้อบฆ่าเชื้อ 180 องศาเซลเซียส รุ่น LUE 660 บริษัท Memmert, Germany
10. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) รุ่น MS1, KIKA Worke, Malaysia
11. เครื่องผสมด้วยคลื่นเสียง (sonicator) รุ่น 275D บริษัท CREST
12. เครื่องเขย่า (shaker) บริษัท FIRSTEK SCIENTIFIC, ORBITAL SHAKER OSI-510
13. เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) บริษัทแล็บ โฟกัสจำกัด, LABOROTA 4001
14. เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 สารเคมี

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
2. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)
3. เด็กซ์โตรส (dextrose)
4. กรดฮิวมิก (humic acid)
5. เปปโตน (peptone)
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NH_2HPO_4)
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

9. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
10. Trace element mix 1 (A8)
11. Vitamins mix A1
12. กรดนาลิซิดิก (nalixidic acid)
13. นิสตาติน (nystatin)
14. แคลเซียมซัลเฟต ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
15. แคลเซียมไดไนเตรด [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]
16. ไดโทเทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
17. โปเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
18. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)
19. Trace element mix 1 (A9)
20. กลูโคส (glucose)
21. สารสกัดจากดิน (soil extract)
22. ดิน (humic soil)
23. แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)
24. โปเทสเซียมไนเตรด (KNO_3)
25. ไดโทเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
26. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
27. แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)
28. ไอออนซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
29. วุ้น (agar)
30. สารละลายทวิน 80 (Tween 80)
31. โซเดียม ลอริลซัลเฟต (Na-Lauryl sulfate)
32. น้ำกลั่น (demineralized water)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อและการคัดแยกเชื้อ

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณต่างๆ ภายในอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร ทั้งหมด 10 ตัวอย่างและตัวอย่างดินในกรุงเทพมหานคร ตัวอย่างละ 500 กรัม นำตัวอย่างดินมาผึ่งลมให้แห้งด้วยลมธรรมชาติ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งมาบดละเอียดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างดินจากข้อ 3.3.1.1 มาแยกเชื้อ โดยใช้วิธีการแยกเชื้อ 4 วิธี คือ

1) การเตรียมตัวอย่างโดยการผึ่งตัวอย่างดินด้วยลมธรรมชาติ (Air dry treatment)

นำตัวอย่างของดินมาทำการตากแห้งด้วยลมธรรมชาติ จากนั้นทำการเจือจางดินที่ตากแห้งด้วยสารละลายทวิน 80 (Tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที ทำให้อนุภาคดินแตกตัวด้วยคลื่นเสียง (sonicator) 30 วินาที เติมสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 10 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงให้ตัวอย่างตกตะกอนที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำดินมาเจือจางในสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที ทำให้อนุภาคดินแตกตัวด้วยคลื่นเสียง (sonicator) 30 วินาที นำมาผสมกับส่วนใสที่แยกไว้ และเจือจางต่อในสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 1:1,000– 1:100,000 ถ่ายส่วนผสมที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Humic acid-salts vitamin agar modified Starch cesien agar และ Soil extract modified ซึ่งเติมกรดนาลิซิดิก (Nalixidix acid) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และนิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส 3-4 สัปดาห์

2) การเตรียมตัวอย่างโดยการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Heat treatment)

นำเอาตัวอย่างดินที่แห้งแล้วไปทำการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างดินที่ตากแห้งในสารละลายทวิน 80 (Tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที ทำให้อนุภาคดินแตกตัวด้วยคลื่นเสียง (sonicator) 30 วินาที เติมสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 10 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงให้ตัวอย่างตกตะกอนที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำดินมาเจือจางในสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที ทำให้อนุภาคดินแตกตัวด้วยคลื่นเสียง (sonicator) 30 วินาที นำมาผสมกับส่วนใสที่แยกไว้ และเจือจางต่อในสารละลายเบสึกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 1:1,000– 1:100,000 ถ่ายส่วนผสมที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Humic acid-salts vitamin agar modified Starch cesien agar และ Soil extract modified ซึ่งเติมกรดนาลิซิดิก (Nalixidix acid) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และนิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส 3-4 สัปดาห์

3) การเตรียมตัวอย่างโดยการใช้น้ำท่วม (Flooding buffer treatment)

อบตัวอย่างที่ตากแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 กรัมใส่หลอดคอปเพนดรอป (ependrof) โดยนำมาเจือจางในสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์สกีม มิลค์ (skim milk) ใน 5 มิลลิโมลาร์ซีเอชอีเอส (CHES; N-cyclohexyl-2-amino ethanesulfonic acid (พีเอช 9) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ถ่ายส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Humic acid-salts vitamin agar modified Starch cesien agar และ Soil extract modified ซึ่งเติมกรดนาลิซิดิก (Nalixidix acid) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และนิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรบ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส 3-4 สัปดาห์

4) การเตรียมตัวอย่างโดยการต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Moist heat treatment)

นำดินที่ผ่านการตากแห้ง 1 กรัมใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) 1 นาที เจือจางต่อในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 1:100 – 1:1,000 ถ่ายส่วนผสมที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Humic acid-salts vitamin agar modified Starch cesien agar และ Soil extract modified ซึ่งเติมกรดนาลิซิดิก (Nalixidix acid) 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และนิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรบ่มจนเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส 3-4 สัปดาห์

3.3.1.3 การคัดแยกเชื้อ

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.3.1.2 มาตรวจสอบเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง จากนั้นนำเข็มเย็บเชื้อปลายแหลม (microneedle) เย็บเชื้อแล้วขีดเป็นเส้นตรงแนวอนบนอาหาร ISP2 ที่ใส่นิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกแล้วมาขีดบนอาหารสูตร Soil extract modified ที่ใส่นิสตาติน (Nystatin) 223 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคการครอส สตรีก (cross streak) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น หากไม่พบการปนเปื้อนให้ทำการย้ายตัวอย่างเชื้อลงอาหารเลี้ยง ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ

คุณลักษณะการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP2 โดยวิธีการครอส สตรีก (cross streak) ตรวจสอบโดยดูการเจริญ และสีของโคโลนีทั้งด้านบนและด้านล่างเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color system, Mundie 1995) ตรวจสอบคุณลักษณะของสปอร์โดยส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ Long-working distant microscope

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน

(agar well diffusion)

3.3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท

เพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลวยีสต์สกัดมอลต์สกัด (yeast extract malt extract broth หรือ ISP2 broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.3.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Micococcus luteus* ATCC 9341 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 (เทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่น (O.D) ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 วัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

เตรียมอาหารมิวเลอส์ฮินตันเอกา (mueller's hinton agar) และ/หรือ ทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและซาโบราวด์เดกโตรสเอกา (sabouraud dextrose agar) สำหรับเลี้ยงยีสต์ ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว

3.3.3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion)

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายในข้อ 3.3.3.2 แล้วทา (swab) ให้ทั่วอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารด้วยแท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และคูนน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีต ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ ตรวจสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร

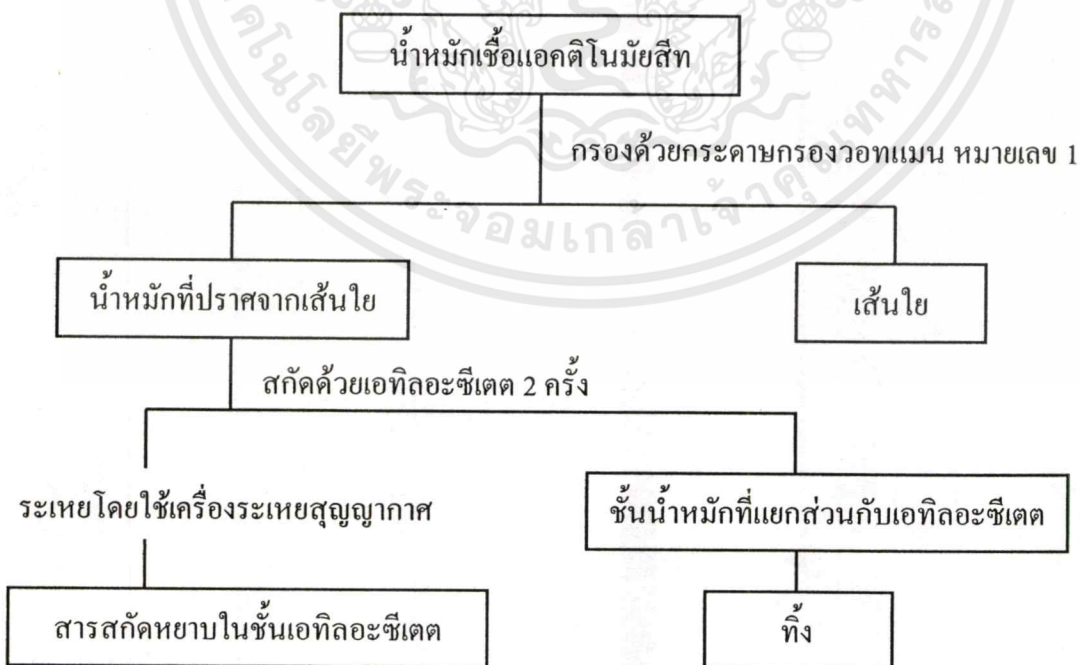
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion) (Lorian, 1980)

3.3.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอสกีโนมัยซีต

เพาะเลี้ยงเชื้อแอสกีโนมัยซีตในอาหารเหลวยีสต์สกัดมอลต์สกัด (yeast extract malt extract broth หรือ ISP2 broth) ปริมาตร 100 มิลลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.3.4.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีต

นำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีตมาทำการสกัดโดยใช้เอทิลอะซีเตต 2 ครั้ง จากนั้นนำมาระเหยในเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporater) จะทำให้ได้สารสกัดในชั้นเอทิลอะซีเตต ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต

3.3.4.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และการเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Micococcus luteus* ATCC 9341 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 (เทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่น (O.D) ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 วัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

เตรียมอาหารมิวเลตส์ฮินตันเอกา (mueller's hinton agar) และ/หรือ ทริปติกชอยเอกา (tryptic soy agar) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและซาโบรอกซ์เดกโตรสเอกา (sabouraud dextrose agar) สำหรับเลี้ยงยีสต์ ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว

3.3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีเอกาดิสก์

ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (Lorian, 1980) โดยอาศัยหลักการแพร่ของสิ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ (disc) ในจานเพาะเชื้อที่มีฐานเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.4.3 แล้วทา (swab) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายบนผิวอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยบบนข้อ 3.3.4.2 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบ รองจานแห้งจากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (inhibition zone)

3.3.5 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition)

3.3.5.1 การแยกดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตร glucose-yeast extract บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยสารละลายซาไลน์-อีดีทีเอ (saline-EDTA) พีเอช 8.0 (pH 8.0) ล้าง 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก (10mM Tris-HCl) 2 ถึง 3 มิลลิลิตร และไลโซไซม์ (lysozyme) 10 ถึง 15 มิลลิกรัม พร้อมทั้งเขย่าให้เป็นเขย่าเนื้อเดียวกัน ซึ่งไลโซไซม์มีผลในการย่อยผนังเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสังเกตเห็นสารละลายเหนียวหนืด เติมสารละลายเอสเอสซีความเข้มข้น 10 เท่า (10X SSC) 60 ไมโครลิตร เติมทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Tris-SDS) 500 ถึง 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที เติมสารละลายฟีนอลต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 ถึง 20 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบน (ส่วนใส) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 99 ที่เย็น (cold ethanol) ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลายดีเอ็นเอในบีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพันสายดีเอ็นเอ แล้วล้างดีเอ็นเอที่พันบนแท่งแก้วด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และร้อยละ 95 ตามลำดับ ตากดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำแท่งแก้วที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ที่ปลายใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอสเอสซีความเข้มข้น 1 เท่า (1X SSC) ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) บนสาย

ดีเอ็นเอ

3.3.6.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) โดยใช้ universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA thermal cycler โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Yukphan และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
ไพรเมอร์ (primer)		
20F	10 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร (pmol/ μ l)	4.0 ไมโครลิตร
1500R	10 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร (pmol/ μ l)	4.0 ไมโครลิตร
ดีเอ็นทีพี (dNTP)	2.0 ไมโครโมลาร์	10.0 ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> buffer	10 เท่า	10.0 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂)	25.0 ไมโครโมลาร์	8.0 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 หน่วยต่อไมโครลิตร (unit/ μ l)	0.5 ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	-	49.5 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ (template)	100 - 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	4.0 ไมโครลิตร
รวม		100.0 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์

20F : GAG TTT GAT CCT GCG TCA G

1500R : GTT ACC TTG TTA CGA CTT

วงจรรีซีอาร์ (โปรแกรม: 16S rDNA)

94 องศาเซลเซียส 3 นาที

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

50 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 5 นาที

รวมเวลาทั้งสิ้น 2 ชั่วโมง 30 นาที

denaturation step

annealing step

extension step

40 รอบ

3.3.6.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีนสลับหอกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA

gene) บนสายดีเอ็นเอ

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่วงยีนสลับหอกเอส อาร์อาร์เอ็นเอ (16S rRNA gene) ที่เพิ่มปริมาณได้จะ ทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ bigdye terminator cycle sequencing ready kit (applied biosystem) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Yukphan และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Big dye terminator	-	2.0 ไมโครลิตร
5X sequencing Buffer	5 เท่า	1.5 ไมโครลิตร
Sequencing Primer	1.6 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร (pmol/μl)	1.0 ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	-	3.5 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	-	2.0 ไมโครลิตร
รวม		10 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์

20F_16S : GAT TTT GAT CTT GGC TCA G
 520F_16S : CAG CAG CCG CGG TAA TAC
 520R_16S : GTA TTA CCG CGG CTG CTG
 920F_16S : AAA CTC AAA TGA ATT GAC GG
 920R_16S : CCG TCA ATT CAT TTGAGT TT
 1500R_16S : GTT ACC TTG TTA CGA CTT

โปรแกรม: Big_dye

96 องศาเซลเซียส 3 วินาที

96 องศาเซลเซียส 10 วินาที

50 องศาเซลเซียส 5 วินาที

60 องศาเซลเซียส 4 นาที

25 รอบ

3.3.7 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software (ในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package) จัดองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.5 package (www.megasoftware.net/) (Yukphan และคณะ, 2005)



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกและการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และกรุงเทพมหานคร ที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเชื้อ 4 วิธี ได้แก่ Air dry treatment Heat treatment Flooding buffer treatment และ Moist heat treatment ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร 3 ไอโซเลต และเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณกรุงเทพมหานคร 10 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

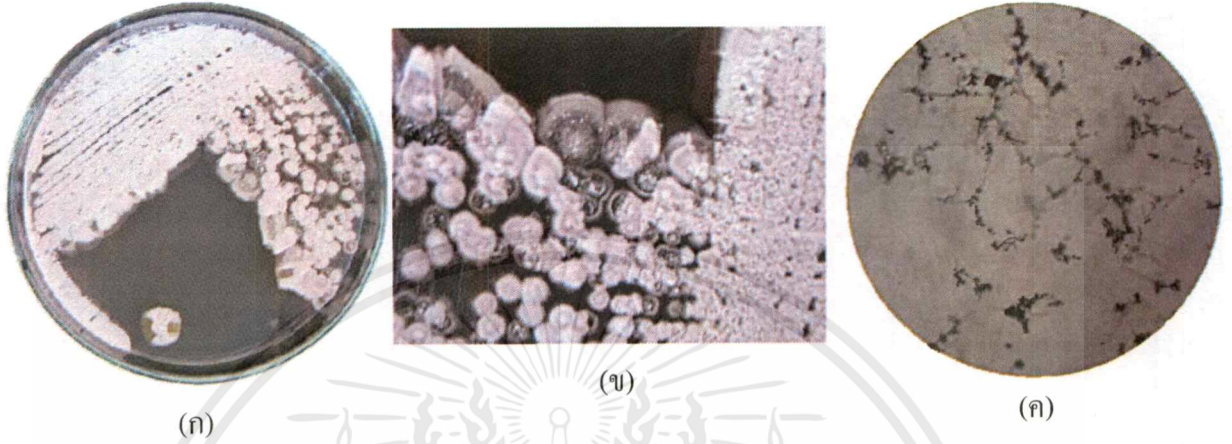
ตารางที่ 4.1 รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่	รหัสเชื้อ
อุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร	KL-A-5-2 KL-B-2-11 KL-B-3-3
กรุงเทพมหานคร	BK1-2 BK1-4 BK2-1 BK2-2 BK2-7 BK5-11 BK9 G17 G20-4 NON6-2

4.2 การตรวจสอบสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ

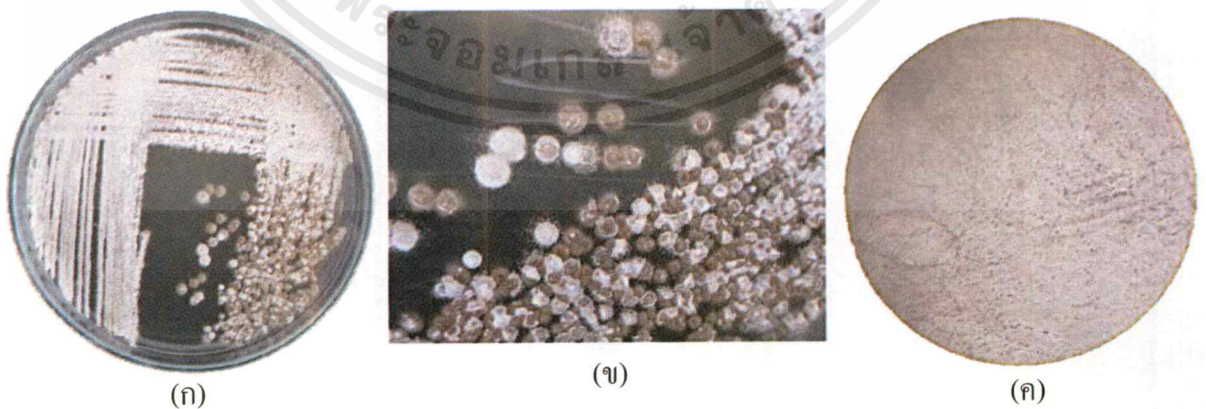
นำเชื้อแอคติโนมัยสีท 13 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract – malt extract agar เพื่อตรวจสอบการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยสังเกตจากการมองเห็นหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 21 วัน เพื่อตรวจสอบการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร ลักษณะสปอร์ และสีของรงควัตถุของเชื้อ พบว่า

เชื้อแอสเพอร์จิลลา โยโซเลต KL-A-5-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีม่วงเข้มมากอมแดง (Very Deep Reddish Purple) เส้นใยอาหารสีม่วงเข้มมากอมแดง (Very Deep Reddish Purple) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาว เป็นเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอสเพอร์จิลลา สกุล *Streptomyces*



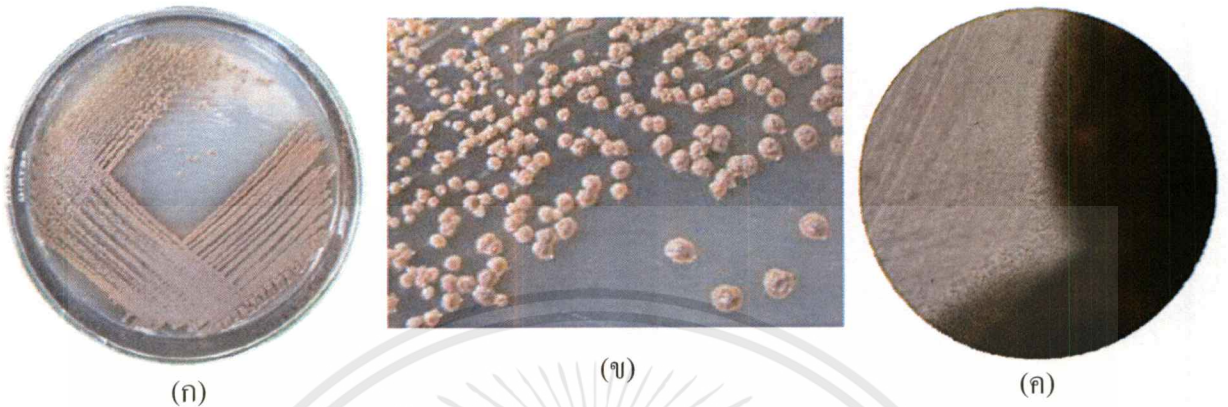
รูปที่ 4.1 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KL-A-5-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอสเพอร์จิลลา โยโซเลต KL-B-2-11 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลสว่างอมเทา (Light Grayish Brown) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายเป็นโซ่ยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอสเพอร์จิลลา สกุล *Streptomyces*



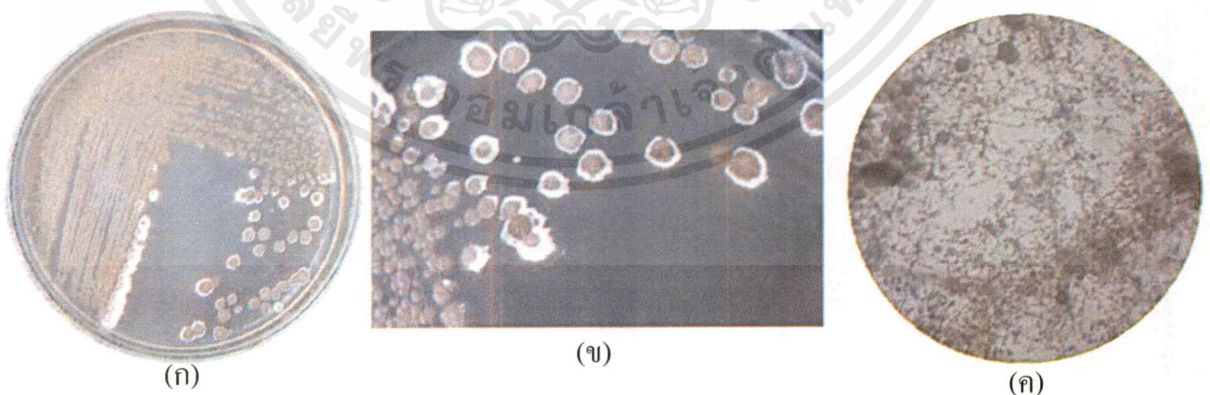
รูปที่ 4.2 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KL-B-2-11 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต KL-B-3-3 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลที่บอมเทา (Dark Grayish Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*



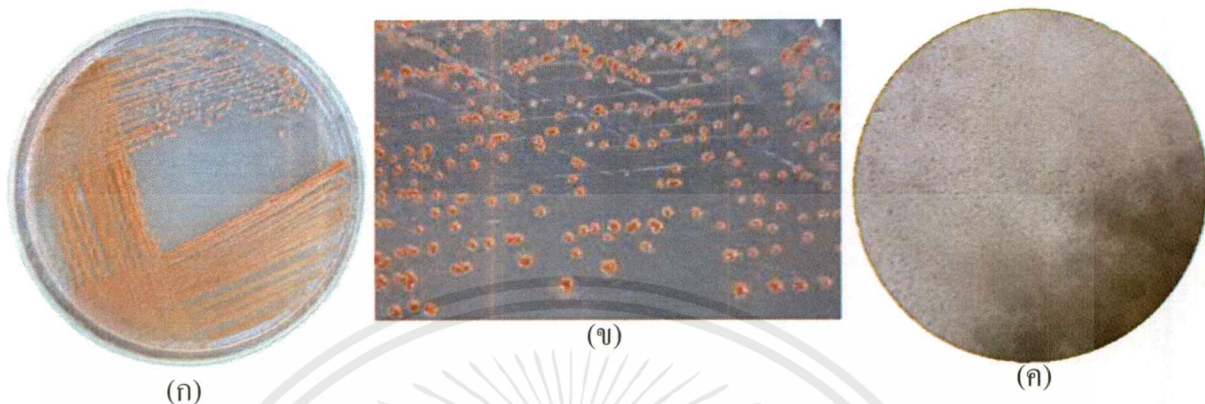
รูปที่ 4.3 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KL-B-3-3 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK1-2 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อนข้างเข้มอมเขียว (Strong Greenish Yellow) เส้นใยอาหารสีเหลืองเข้มอมเขียว (Deep Greenish Yellow) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces*



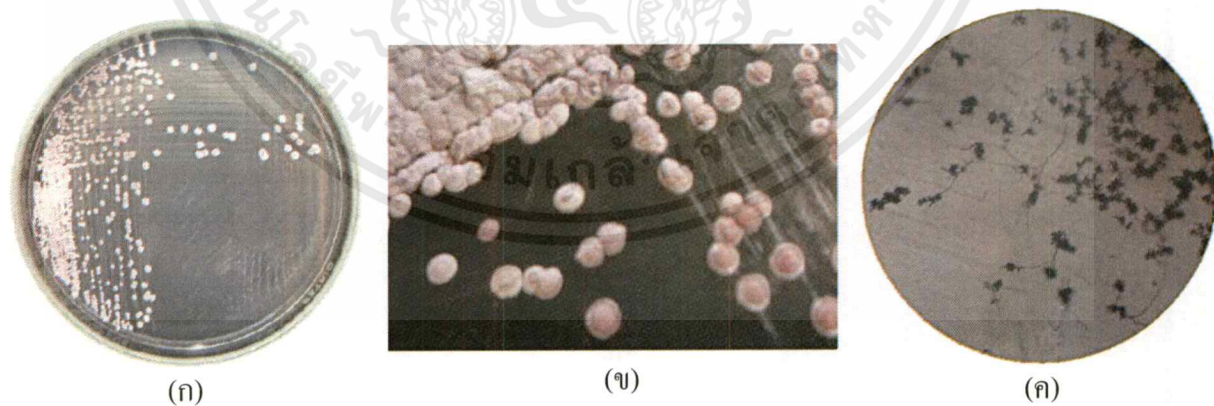
รูปที่ 4.4 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BK1-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK1-4 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เดี่ยว บนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*



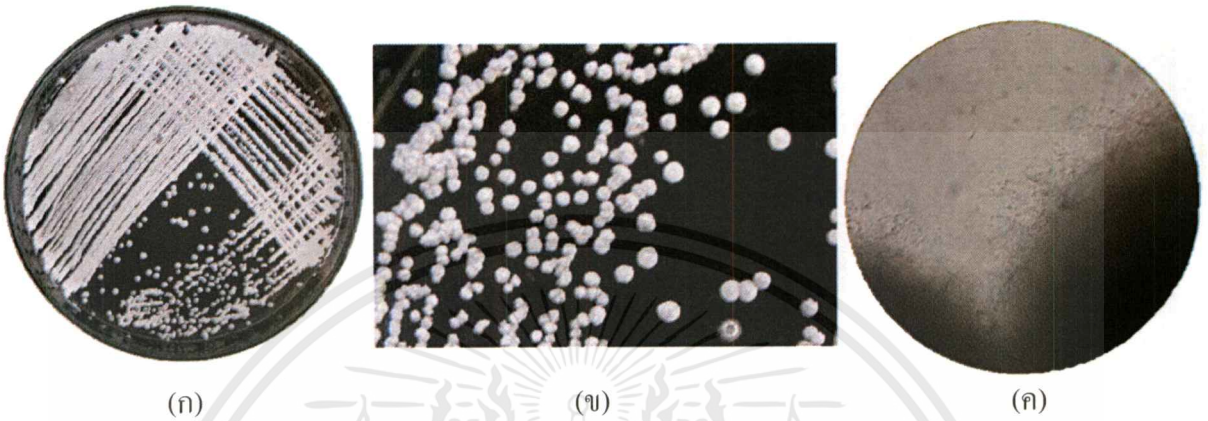
รูปที่ 4.5 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BK1-4 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-1 เจริญได้ปานกลางในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศ สีเทาอมแดง (Reddish Gray) เส้นใยอาหารสีแดงที่เข้มมาก (Very Dark Red) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายเป็นตะขอหรือเกลียวสั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Actinomadura*



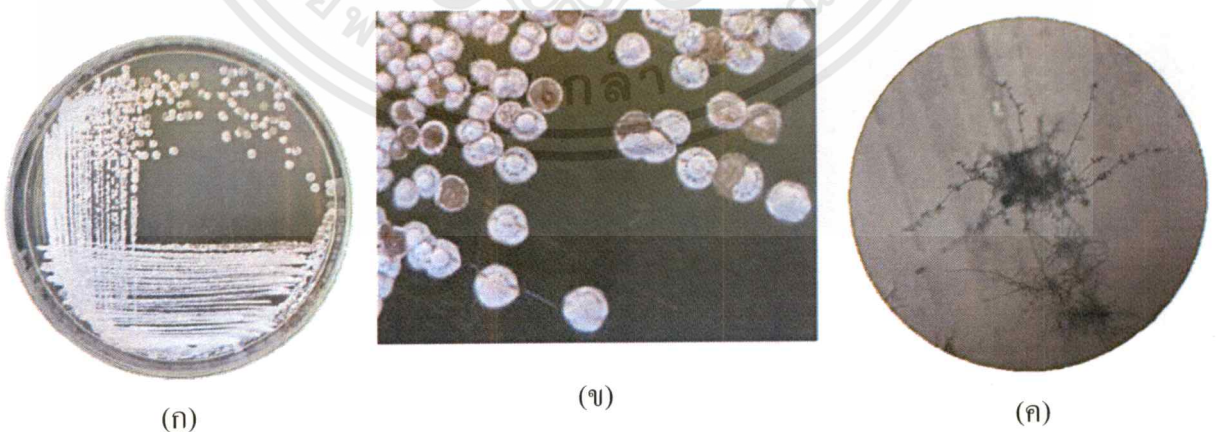
รูปที่ 4.6 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BK2-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีเทา สว่างอมเขียว (Light Greenish Gray) เส้นใยอาหารสีน้ำตาล (Moderate Brown) และมีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองส้มใส (Vivid Orange Yellow) สร้างสปอร์เป็นสายเป็นตะขอหรือเกลียวสั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ แอกติโนมัยซีทสกุล *Actinomadura*



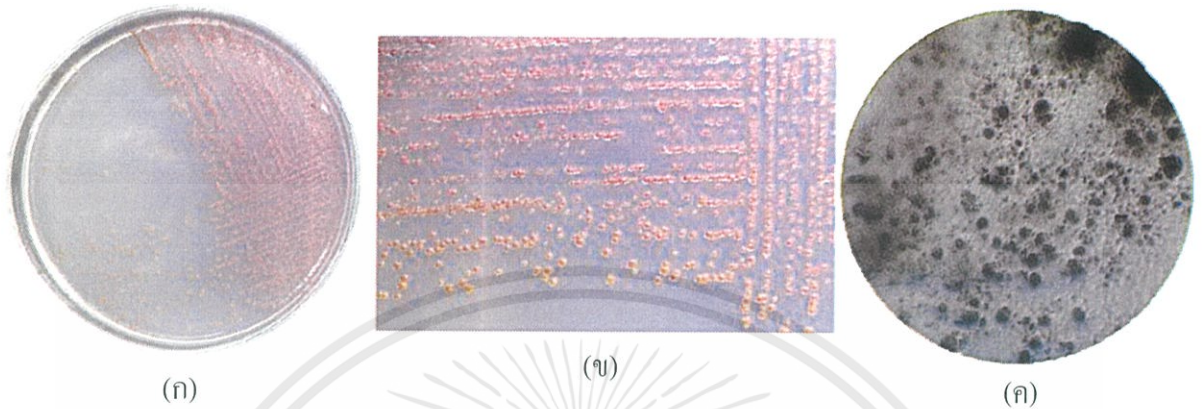
รูปที่ 4.7 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BK2-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-7 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีฟ้าอ่อนมาก (Very Pale Blue) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้มอมเหลือง (Deep Yellowish Brown) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายเป็นตะขอหรือเกลียวสั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Actinomadura*



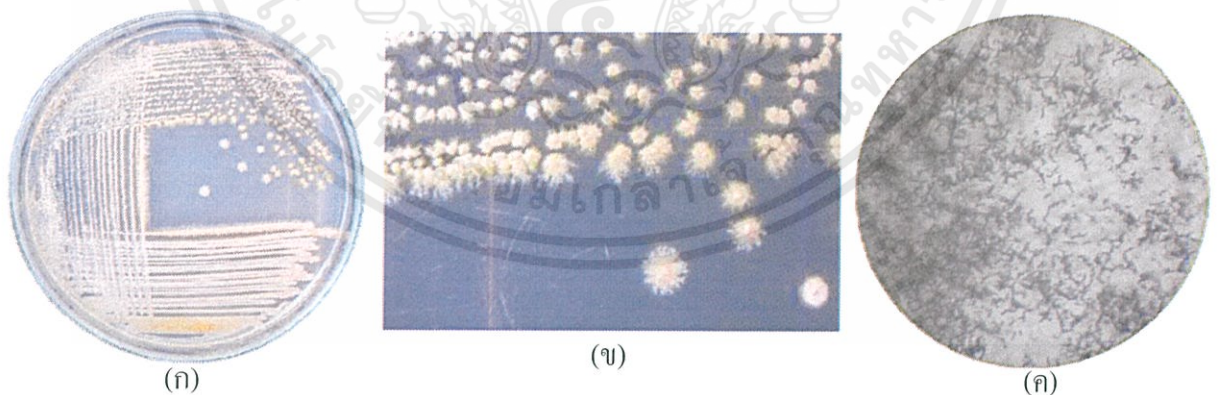
รูปที่ 4.8 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BK2-7 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK5-11 เจริญได้น้อยในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอาหารสีชมพูที่บอมเหลือง (Dark Yellowish Pink) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*



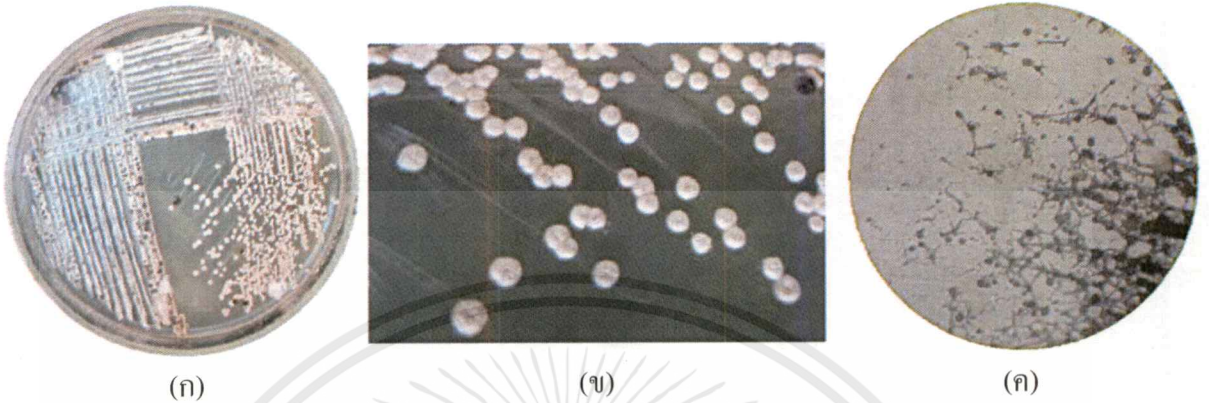
รูปที่ 4.9 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะ โคลินิของเชื้อไอโซเลต BK5-11 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK9 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีส้ม (Moderate Orange) เส้นใยอาหารสีส้มโตมแดง (Vivid Reddish Orange) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Nocardia*



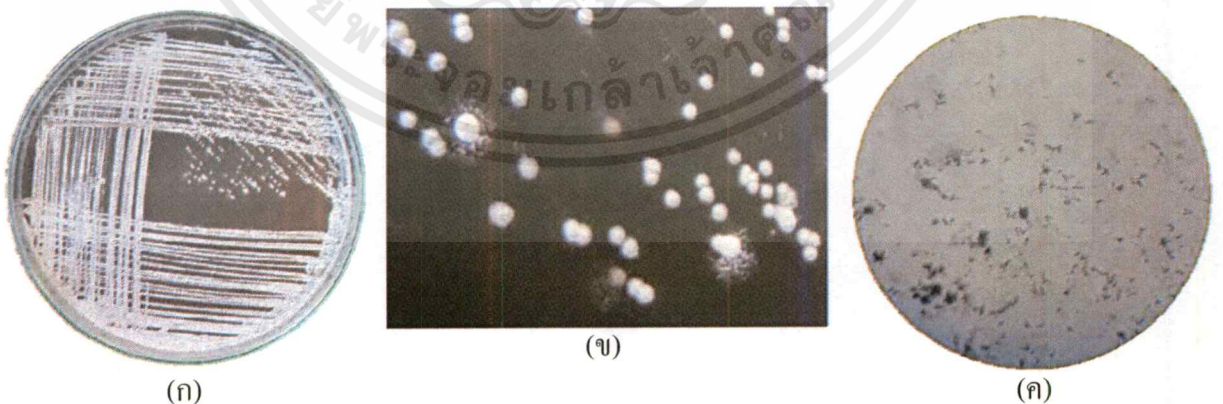
รูปที่ 4.10 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะ โคลินิของเชื้อไอโซเลต BK9 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต G17 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (White) เส้นใยอาหารสีเหลืองพราว (Brilliant Yellow) และไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายยาวเป็นเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*



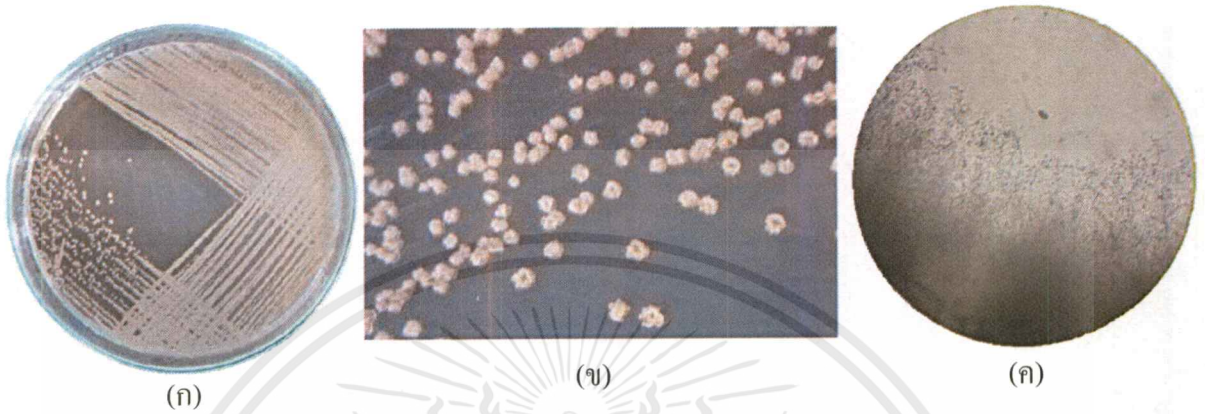
รูปที่ 4.11 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต G17 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต G20-4 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลสว่างอมเทา (Light Grayish Brown) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown) และสร้างรงควัตถุสีเหลืองอมส้มเข้ม (Deep Orange Yellow) สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Nocardia*



รูปที่ 4.12 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต G20-4 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต NON6-2 เจริญได้ดีในอาหาร ISP 2 ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาล (Moderate Brown) และมีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.13 (ก)และ(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต NON6-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 21 วัน

เชื้อ	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
KL-A-5-2	ดีมาก	ม่วงเข้มมากอมแดง (Very Deep Reddish Purple, 0.9yr 1.9 8.9)	ม่วงเข้มมากอมแดง (Very Deep Reddish Purple, 0.9yr 1.9 8.9)	-
KL-B-2-11	ดี	น้ำตาลสว่างอมเทา (Light Grayish Brown, 6.4yr 5.4 2.2)	น้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown, 4.6yr 3.5 7.6)	-
KL-B-3-3	ดี	-	น้ำตาลที่บอมเทา (Dark Grayish Brown) 5.5yr 2.0 1.5	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะการเจริญและสีพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 21 วัน

เชื้อ	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
BK1-2	ดี	เหลืองค่อนข้างเข้มอมเขียว (Strong Greenish Yellow, 9.2y 7.2 9.2)	เหลืองเข้มอมเขียว (Deep Greenish Yellow, 9.2y 5.9 9.2)	-
BK1-4	ดี	-	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange, 4.1yr 5.0 8.0)	-
BK2-1	ปานกลาง	เทาอมแดง (Reddish Gray, 7.0r 5.4 1.3)	แดงที่เข้มมาก (Very Dark Red, 2.0r 1.2 4.8)	-
BK2-2	ดีมาก	เทาสว่างอมเขียว (Light Greenish Gray, 3.0g 7.5 0.9)	น้ำตาล (Moderate Brown, 5.6yr 3.5 3.9)	เหลืองส้มใส (Vivid Orange Yellow, 8.6yr 7.3 15.2)
BK2-7	ดี	ฟ้าอ่อนมาก (Very Pale Blue, 1.5pb 8.3 3.3)	น้ำตาลเข้มอมเหลือง (Deep Yellowish Brown, 8.8yr 3.1 5.0)	-
BK5-11	น้อย	-	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange, 4.1yr 5.0 8.0)	-
BK9	ดี	ส้ม (Moderate Orange, 4.6yr 6.5 8.2)	ส้มใสอมแดง (Vivid Reddish Orange, 9.8r 5.4 14.5)	-
G17	ดี	ขาว (White, 2.5pb 9.5 0.2)	เหลืองพราว (Brilliant Yellow, 4.4y 8.7 8.9)	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 21 วัน

เชื้อ	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
G20-4	ดี	น้ำตาลสว่างอมเทา (Light Grayish Brown, 6.4yr 5.4 2.2)	น้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown, 4.6yr 3.5 7.6)	เหลืองอมส้มเข้ม (Deep Orange Yellow, 8.6yr 6.0 12.1)
NON6-2	ดี	-	น้ำตาล (Moderate Brown, 5.6yr 3.5 3.9)	น้ำตาลค่อนข้างเข้ม (Strong Brown, 4.6yr 3.5 7.6)

4.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมไทป์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทได้ผลดังนี้ เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต KL-A-5-2 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces massaporeus* และ *Streptomyces hawaiiensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.6 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 42 (รูปที่ 4.14)

เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต KL-B-2-11 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces seoulensis* และ *Streptomyces peucetius* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 32 (รูปที่ 4.15)

เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต BK1-2 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces neyagawaensis* และ *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *ossamycetius* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 63 (รูปที่ 4.16)

เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต G17 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces angustmycinicus* และ *Streptomyces angustmyceticus* มากที่สุด

ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 43 (รูปที่ 4.17)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura madurae* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 86 (รูปที่ 4.18)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-2 และ BK2-7 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura bangladeshensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 93.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 81 (รูปที่ 4.18)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต KL-B-3-3 และ NON6-2 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora sediminicola* และ *Micromonospora maritima* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 88 (รูปที่ 4.19)

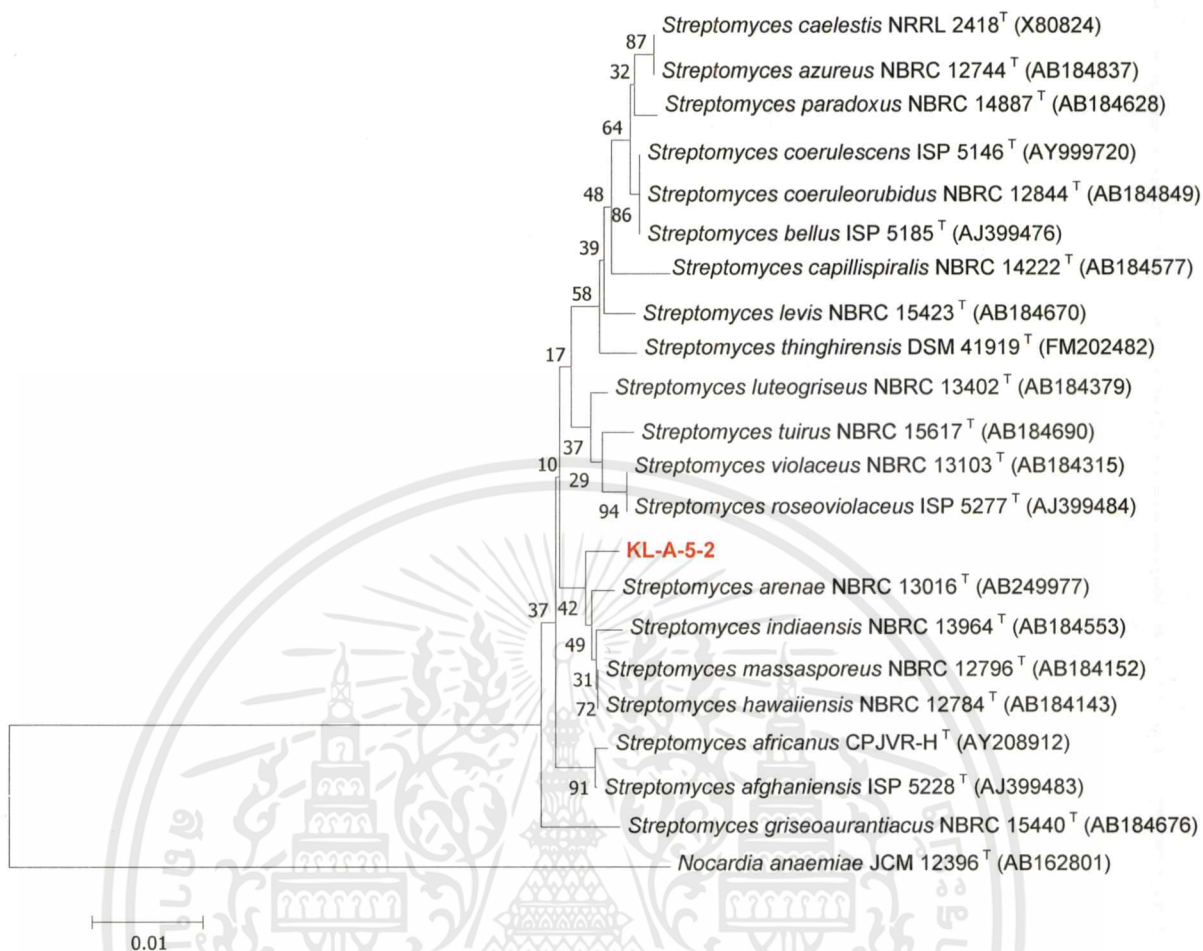
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK1-4 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora krabiensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.19)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK5-11 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora endolithica* และ *Micromonospora fulviviridis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 8 (รูปที่ 4.19)

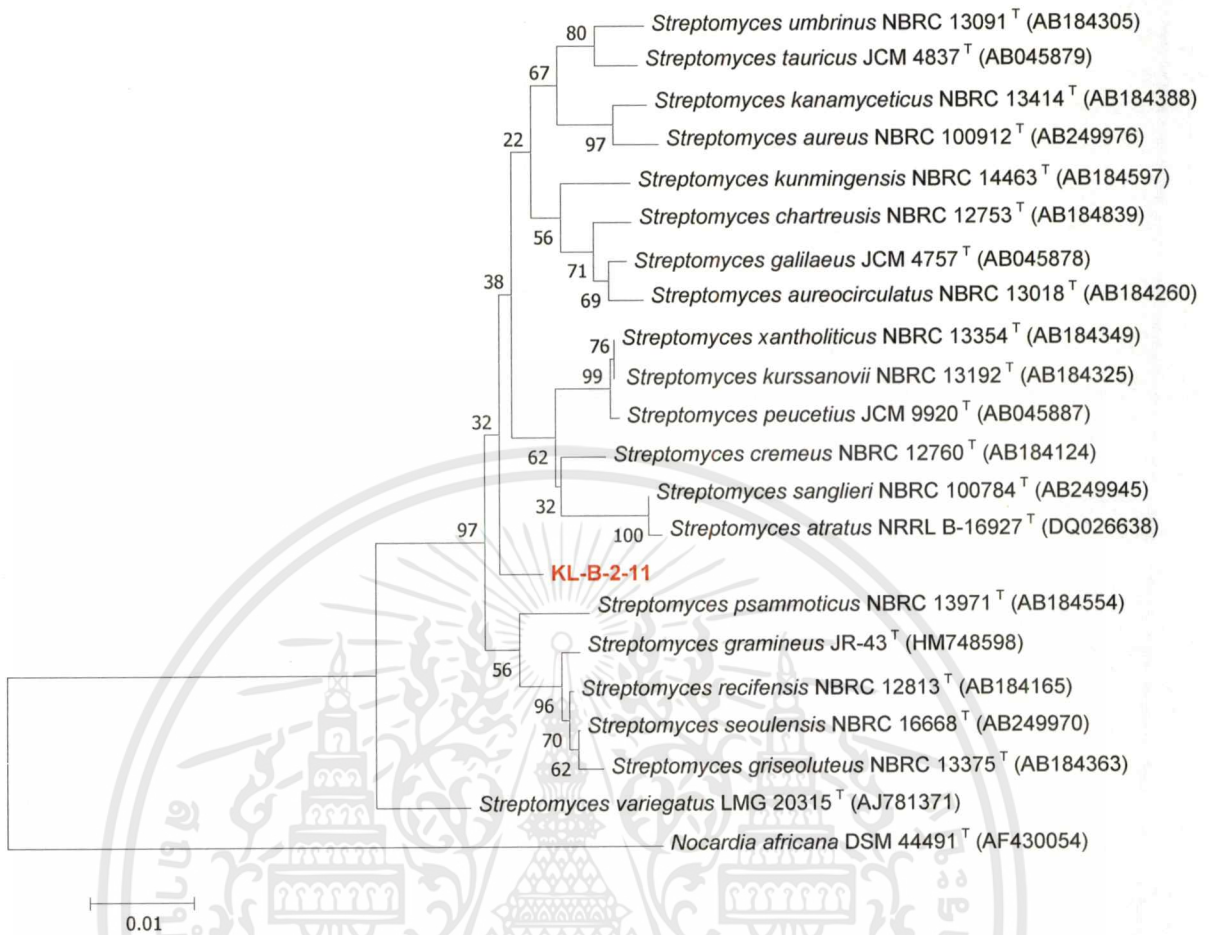
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BK9 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia niigatensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 100 (รูปที่ 4.20)

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต G20-4 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia beijingensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 91 (รูปที่ 4.20)

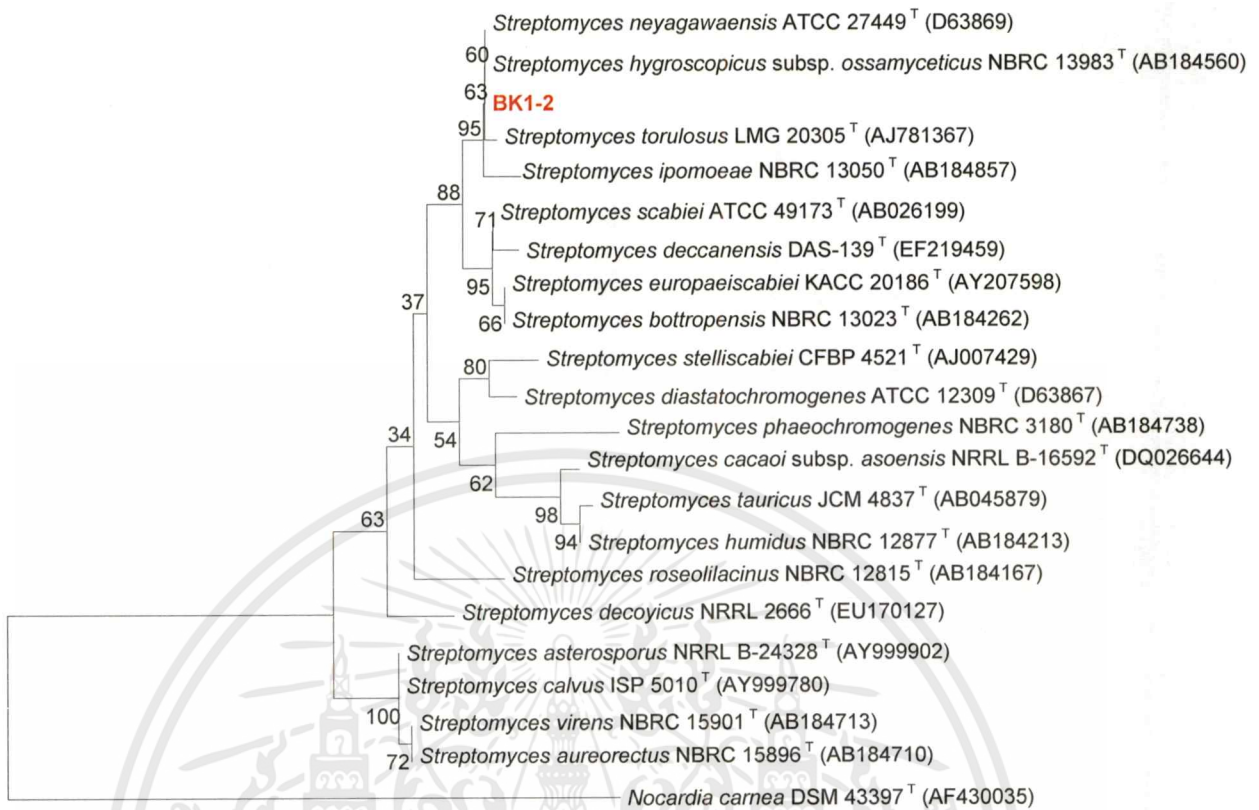




รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งของเชื้อ KL-A-5-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



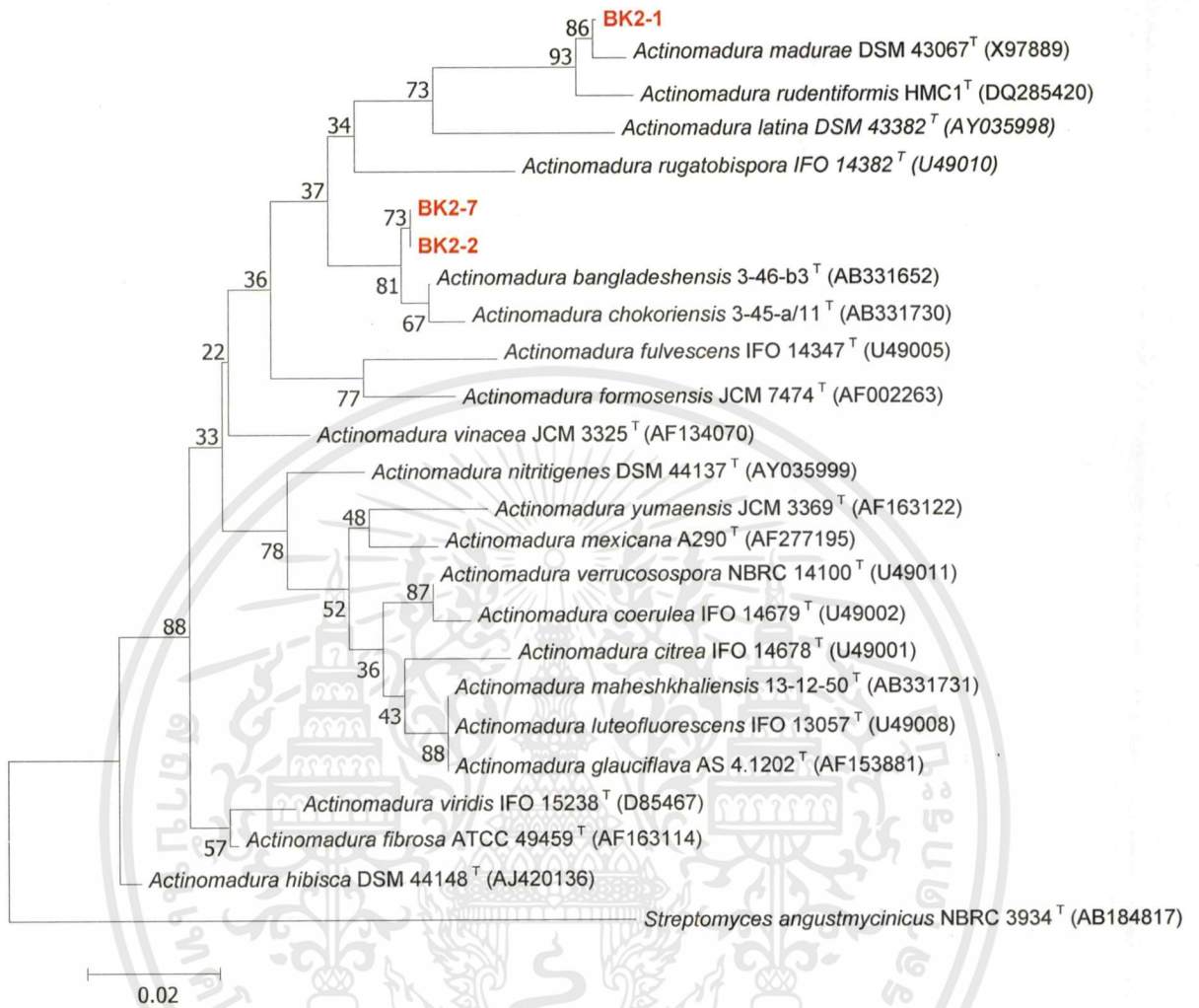
รูปที่ 4.15 แสดงตำแหน่งของเชื้อ KL-B-2-11 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



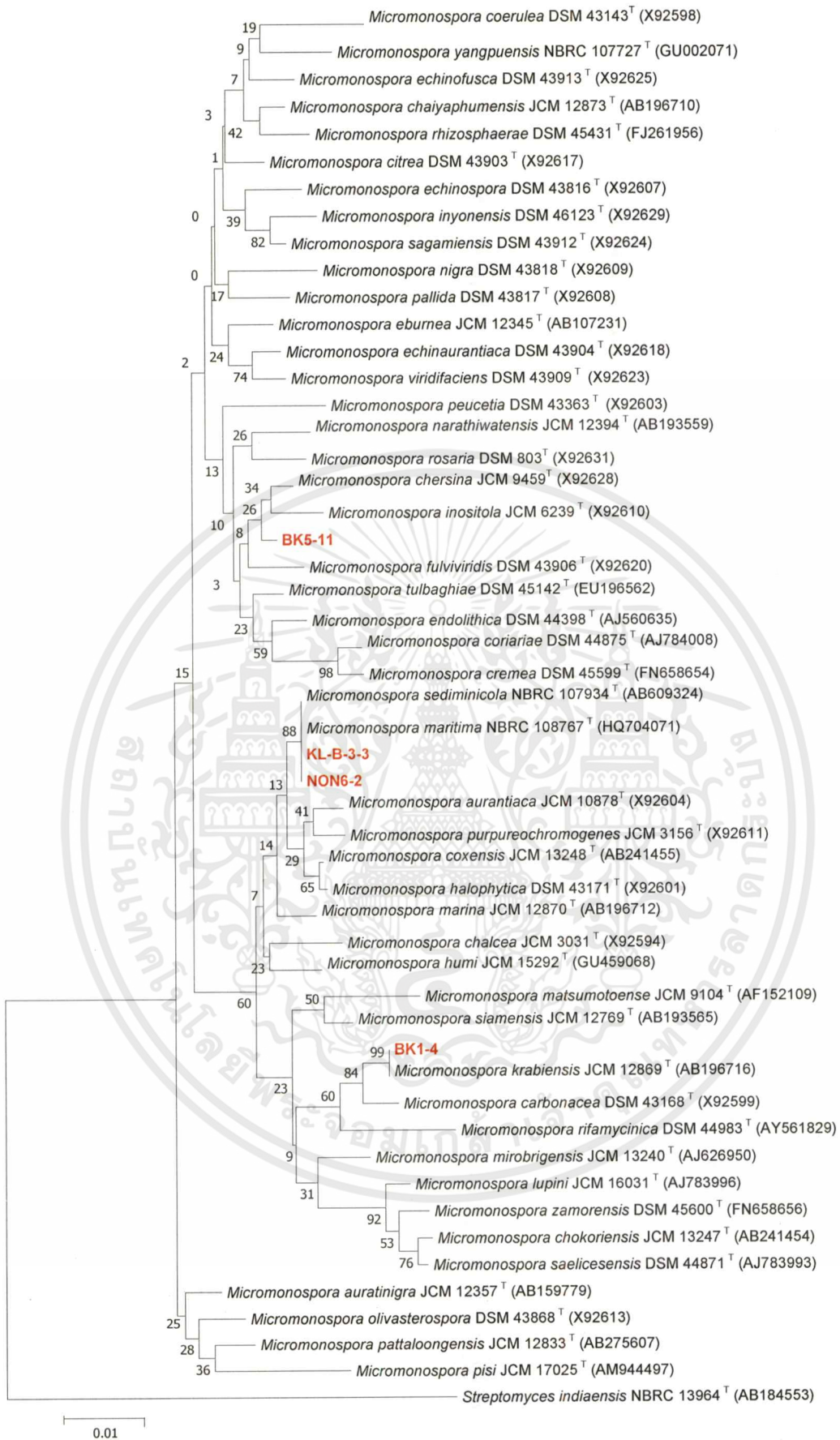
รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BK1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



รูปที่ 4.17 แสดงตำแหน่งของเชื้อ G17 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

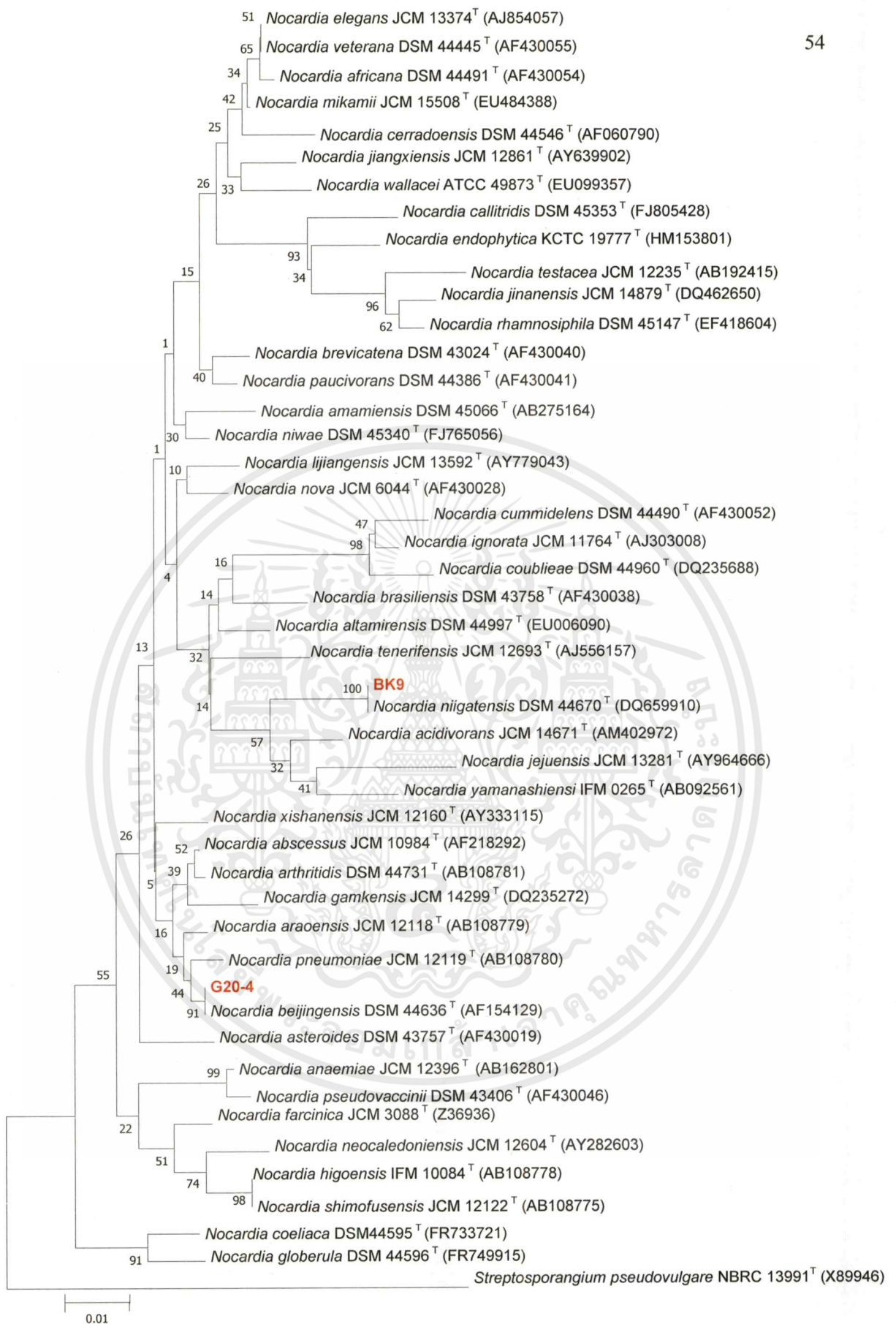


รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BK2-1 BK2-2 และ BK2-7 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



รูปที่ 4.19 แสดงตำแหน่งของเชื้อ KL-B-3-3 NON6-2 และ BK1-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BK9 และ G20-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method) ที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

4.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ 13 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลต สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 23.08 ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อยีสต์ พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จำนวน 1 ไอโซเลต สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 จำนวน 3 ไอโซเลต และสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จำนวน 1 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar well diffusion

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>C. albicans</i>
KL-A-5-2	-	-	-	-	-	-	-
KL-B-2-11	-	-	-	-	-	-	-
KL-B-3-3	-	-	-	-	-	-	-
BK1-2	-	-	-	-	-	-	-
BK1-4	-	-	-	-	-	-	-
BK2-1	-	-	-	-	-	-	-
BK2-2	-	-	-	-	-	-	-
BK2-7	-	-	-	-	-	-	-
BK5-11	-	-	-	7.25	-	-	-
BK9	-	-	-	9.25	-	-	-
G17	-	-	10.00	8.50	7.00	-	-
G20-4	-	-	-	-	-	-	-
NON6-2	-	-	-	-	-	-	-

4.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar disc diffusion

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ 13 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 7 ไอโซเลต สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ คิดเป็นร้อยละ 53.85 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อยีสต์ พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 จำนวน 5 ไอโซเลต สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จำนวน 4 ไอโซเลต สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 จำนวน 5 ไอโซเลต และสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จำนวน 5 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.4



ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar disc diffusion

รหัสเชื้อ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
		<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	MRSA	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
KL-A-5-2	ความเข้มข้น							
	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
KL-B-2-11	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/ml	-	-	11	8	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
KL-B-3-3	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/ml	-	-	13	-	9	8	-
	1 mg/ml	-	-	9	-	-	-	-
BK1-2	500 µg/ml	-	-	8	-	-	-	-
	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
BK1-4	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar disc diffusion

รหัสเชื้อ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
		<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	MRSA	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
BK2-1	50 mg/ml	-	-	24	26	18	21	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
BK2-2	50 mg/ml	-	-	14	8	13	14	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
BK2-7	50 mg/ml	-	-	20	13	18	15	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
BK5-11	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
BK9	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี Agar disc diffusion

รหัสเชื้อ / ความเข้มข้น		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
		<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	MRSA	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
G17	50 mg/ml	-	-	-	16	13	11	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
G20-4	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-
NON6-2	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-
	500 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

E.coli = *Escherichia coli* ATCC 25922

Ps.aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785

M.luteus = *Micrococcus luteus* ATCC 9341

B.subtilis = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

S.aureus = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

C.albicans = *Candida albicans* ATCC 1023

MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654

บทที่ 5

สรุปวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และกรุงเทพมหานคร สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่น่าสนใจได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต และทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา และศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ พบว่า

เชื้อไอโซเลต KL-A-5-2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces massaporeus* NBRC 12796^T และ *Streptomyces hawaiiensis* NBRC 12784^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.6

เชื้อไอโซเลต KL-B-2-11 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสาย มีลักษณะเป็นโซ่ยาวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces seoulensis* NBRC 16668^T และ *Streptomyces peucetius* JCM 9920^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.8

เชื้อไอโซเลต BK1-2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449^T และ *Streptomyces hygrosopicus subsp. ossamycetius* NBRC 13983^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100

เชื้อไอโซเลต G17 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T และ *Streptomyces angustmyceticus* NRRL B-2347^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.8

เชื้อไอโซเลต BK2-1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสาย มีลักษณะเป็นตะขอหรือเกลียวสั้น มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Actinomadura* และพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Actinomadura madurae* DSM 43067^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.4

เชื้อไอโซเลต BK2-2 และ BK2-7 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เป็นสาย มีลักษณะเป็นตะขอหรือเกลียวสั้น มีลักษณะทางจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Actinomadura* และพบว่ามี ความ

คล้ายคลึงกับเชื้อ *Actinomadura bangladeshensis* 3-46-b3^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 93.8

เชื้อไอโซเลต KL-B-3-3 และ NON6-2 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางจีโนมไทป์เป็นเชื้อสกุล *Micromonospora* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora maritima* NBRC 108767^T และ *Micromonospora sediminicola* NBRC 107934^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100

เชื้อไอโซเลต BK1-4 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางจีโนมไทป์เป็นเชื้อสกุล *Micromonospora* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora krabiensis* JCM 12869^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 100

เชื้อไอโซเลต BK5-11 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางจีโนมไทป์เป็นเชื้อสกุล *Micromonospora* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora endolithica* DSM 44398^T และ *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T มากที่สุด ด้วยความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99

ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Arifuzzaman และคณะ (2010) ซึ่งทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในพื้นที่ Karanjai ใน Sundarbans ได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลต และถูกจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเป็นเชื้อสกุล *Actinomyces* 27 ไอโซเลต สกุล *Nocardia* 14 ไอโซเลต สกุล *Streptomyces* 11 ไอโซเลต และสกุล *Micromonospora* 3 ไอโซเลต รวมทั้งรายงานของ Valan และคณะ (2009) ได้มีการวิจัยถึงฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในหลอดทดลองของสกุล *Streptomyces* ที่คัดแยกได้เป็นอีอาร์ไอ-สาม (ERI - 3) จากดินที่เทือกเขากัสท์ประเทศอินเดีย เชื้อที่คัดแยกจากดินของเทือกเขากัสท์ ประเทศอินเดียอินเดีย พบว่าเป็นสกุล *Streptomyces* ชนิดของดินเป็นสีน้ำตาลและสีเทา อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 22 ถึง 26 องศาเซลเซียส เป็นป่าที่ประกอบด้วยยาง (*Hevea brasiliensis*) พริกไทย (*Piper longum*) กานพลู (*Syzygium caryophyllatum*) และอารียาม (Areca - Nut)

การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Candida albicans* ATCC 10231 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 โดยใช้วิธี agar well diffusion และวิธี agar disc diffusion พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 8 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ดังนี้

เชื้อไอโซเลต KL-B-2-11 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

เชื้อไอโซเลต KL-B-3-3 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654

เชื้อไอโซเลต BK2-1 BK2-2 และ BK2-7 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654

เชื้อไอโซเลต BK5-11 และ BK9 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

เชื้อไอโซเลต G17 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654

จากการทดสอบฤทธิ์กิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แยกได้จากดิน พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Candida albicans* ATCC 10231 และ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tara Devi Gurung และคณะ (2009) ที่พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แยกจากดินบริเวณเทือกเขา Kalapatthar ประเทศเนปาล เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมการต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* ATCC-29213 Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Proteus mirabilis* ATCC-49132 *Proteus vulgaris* *Klebsiella pneumonia* *Klebsiella oxytoca*, *Shigella* species *Salmonella typh*, *Salmonella paratyphi* A นอกจากนี้รายงานของ Thakur และคณะ (2007) ที่พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แยกจากดินบริเวณพื้นที่ป่า รัฐอัสสัมและตรีปุระ ประเทศอินเดีย เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมการต้านทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งรายงานของ Ebru Ince Yilmaz และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แยกจากดิน เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Candida albicans* จากรายงานข้างต้นจึงสนับสนุนว่าเชื้อแอกติโนมัยสิตจากดินเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีคุณค่าต่อการศึกษาทางด้านเภสัชศาสตร์ เพราะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและหลากหลาย

ในการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมและง่ายสำหรับการแยกเชื้อแอกติโนมัยสิต เนื่องจากพบเชื้อในหลายสกุลและยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งผลการวิจัยนี้ทำให้สามารถรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนมัยสิตจากดินในบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และดินในบริเวณจังหวัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งมีประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธาน และยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในงานวิจัยด้านอื่นๆต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เกษม ชนเศรษฐรงค์. ญัฐวรรณ อยู่ล่อ และชนศ สุริยะรังสี.2552.การคัดกรองเชื้อ

แอกติโนมัยสัที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดิน. ครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์
บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คมสันต์ สุป้อง และพิมพ์ชนก กนกลาวัลย์.2550.การคัดแยกและตรวจสอบลักษณะเชื้อสกุล

ไมโครไบสปอราจากดินทางภาคตะวันตกของประเทศไทย. ครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์
บัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง.

งามนิจ นนทโส. 2537ข. Antibiotic susceptibility test.ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
ขอนแก่น. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดวงพร คันธโชติ.2537.อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและบทปฏิบัติการ.สำนักพิมพ์โอเดียนส ไตร์.
กรุงเทพฯ.200หน้า

ไพรัตน์ สงทอง. 2551. เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย gel Electrophoresis. [Online].Available :
www.satriwit.ac.th/.../index.php

เมธี เอกเสวตอนันต์. วาสนี ธรรมสถิต และสุจินันท์ ยาประเสริฐ.2552.การแยกและการตรวจสอบ
ลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสัที่แยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดกระบี่. ครงงาน
พิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริรัตน์ ทองอุ่น.2552.การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอกติโนมัยสัที่แยก
ได้จากทะเล. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมใจ ศิริโชค. 2545. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ.
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. นีรนาม. 2550.

- Berdy, J. 2005 .Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58:1-26.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolate from a Saharan soil. Microbiology research.161 : 288-289.
- Ebru Ince, Y., Murat, Y. and Murat K. 2008. Molecular characterization of rhizospheric soil streptomycetes isolated from indigenous Turkish plants and their antimicrobial activity. Microbiol Biotechnol. 24 : 1461-1470
- Glazer, A. N. and Nikaido, H. 1994. Microbial Biotechnology. W. H. Freeman. USA.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Mundie, D. A. 1995. The NBS/ISCC Color System. Pittsburgh, PA:Polymath Systems 535.6 dc-20 (<http://www.tx4.us/nbs-iscc.htm>, accessed February 2011).
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbisporu* and *Streptosporungium* strains in soil (part 2). Classification of the isolates. J. Ferment. Technol. 47:70 1-709.
- Okami, Y. and Hotta, K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. In Actinomycetes in Biotechnology, pp. 33–67. Edited by M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski. London: Academic Press.
- Komagata, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. Methods Microbiol 19, 161–206.
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int J Syst Bacteriol 20, 435–443.
- Liu, D., N.A. Anderson, and L.L. Kinkel. 1996. Selection and characterization of strains of *Streptonzyces* suppressive to the potato scab pathogen. Can. J. Microbil. 42:487-502.
- Lorian, V. 1980. Antibiotic in laboratory medicine. Williams and Walkins company. Baltimore
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology. 47 : 479-491.
- Tara Devi, G., Chringma, S., Vishwanath, P. and Binod, L. (2009). Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology. 10 : 173-182

- Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B. K. and Bora TC. 2007. Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Mycol Med*;17:242—9
- Valan Arasu, M., Duraipandiyan, V., Agastian, P. and Ignacimuthu, S. 2009. In vitro antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-3 isolated from Western ghats rock soil (India). *J Mycol Med*;19 : 22—8.
- Vobis, G. 1997. Morphology of Actinomycetes. *In Atlas of Actinomycetes*. (Miyado, S., ed.), p.180-191. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- William, R. H. 1989. *Bergey' Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Baltimore. Williams&Wilkins. U.S.A.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2005. *Neosasaia Chiangmaiensis* gen. nov., sp. Nov., a novel osmotolerant acetic acid in the α -Proteobacteria. *Journal of Applied Microbiological*.51 : 301-311.
- Yukphan, P. 2006. Systematic study of acetic acid bacteria isolated in Thailand. Ph.D. of The United Graduated School of Agriculture Science, Gifu University. Japan.
- Zhi, X.Y., Li, W.J. and Stackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology*.59 : 589-608.
- [Online].Available :<http://www.tropicalforest.or.th/> (7/7/2554)
- [Online].Available :<http://classroom.sdmesa.net/eschmid/Lecture16-Microbio.htm> (8/10/2554)
- [Online].Available :<http://www.colorado.edu/eeb/EEBprojects/schmidtlab/studentres/EBIO3400/HighGCGm.pdf> (8/10/2554)
- [Online].Available :<http://www.sciencephoto.com/media/13149/enlarge> (8/10/2554)
- [Online].Available :<http://www.actinogen.com.au> (8/10/2554)
- [Online].Available :<http://www.stks.or.th/blog/?p=10966> (8/10/2554)
- [Online].Available :<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nystatin.png> (28/11/2554)
- [Online].Available :<http://www.antibioticslist.com/> (28/11/2554)

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract-Malt extract agar (ISP2)

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Dextrose	4	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.3		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Humic acid-vitamin agar (สูตรดัดแปลง) ที่เดิมสารปฏิชีวนะ

Humic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH 10 มิลลิลิตร)	1	กรัม
Yeast extract	50	มิลลิกรัม
Peptone	20	มิลลิกรัม
Na ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
KCl	1.7	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	มิลลิกรัม
CaCl ₂	10	มิลลิกรัม
Trace element mix 1	0.2	มิลลิลิตร
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Vitamins mix	1	มิลลิลิตร
--------------	---	-----------

Nalixidic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	25	มิลลิกรัม
Nystatin (223 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร)	2.33	มิลลิลิตร

Soil extract agar (สูตรดัดแปลง) ที่เติมสารปฏิชีวนะ

CaSO ₄ •2H ₂ O	0.5	กรัม
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	0.25	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	กรัม
K ₂ SO ₄	0.03	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.02	กรัม
NaHCO ₃	0.1	กรัม
Trace element mix 1	0.3	มิลลิลิตร
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.02	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Peptone	0.1	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Soil extract	100	มิลลิลิตร
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		
Vitamins mix	1	มิลลิลิตร
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	25	มิลลิกรัม
Nystatin (223 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร)	2.33	มิลลิลิตร

Soil extract

Humic soil	1	กิโลกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรองด้วยสำลี และทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (นำส่วนใสไปใช้)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Vitamin Mix A1

p-aminobenzoic acid	50	มิลลิกรัม
Calcium pantothenate	50	มิลลิกรัม
Inositol	50	มิลลิกรัม
Niacin	50	มิลลิกรัม
Pyridoxin HCl	50	มิลลิกรัม
Riboflavin	50	มิลลิกรัม
Thiamine HCl	50	มิลลิกรัม
Biotin	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร		

Trace elements mix 1

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	กรัม
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5	กรัม
KI	0.05	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
H_2SO_4 95-97% p.a.	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Starch Casein Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ

Soluble starch	10	กรัม
KNO_3	2	กรัม
Casein sodium caseinate	0.3	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม

MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	กรัม
NaCl	2	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	25	มิลลิกรัม
Nystatin (223 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร)	2.33	มิลลิลิตร

Tryptic Soy Agar

Casein peptone	17	กรัม
Soy peptone	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

Basic lauryl-sulfate solution (SLS)

Na-Lauryl sulfate	0.1	กรัม
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.8-7.0 (KOH/HCl)		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

Tween 80 solution

Tween 80	0.1	มิลลิลิตร
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.8-7.0 (KOH/HCl)		
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

Flooding solution

skim milk	0.1	กรัม
5 mM CHES (N-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid) (pH 9.0)	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	986	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1M EDTA (pH 8.0)

EDTA	372.24	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ผสม EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

1M Tris-Cl (pH 8.0)

Tris-base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น		

ผสม Tris-base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

ภาคผนวก ค

กระดาศสีมาตรฐาน

กระดาศสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color system, Mundie 1995)

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
Red, Pink			
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	

24 Reddish Black 2.0r 0.9 0.9 #1E1112

Yellowish Pink

25 Vivid Yellowish Pink 8.0r 8.0 13.0 #FF845C

26 Strong Yellowish Pink 8.4r 7.0 9.5 #FF7A5C

27 Deep Yellowish Pink 5.5r 5.8 12.1 #F64A46

28 Light Yellowish Pink 1.9yr 8.2 4.6 #FFB28B

29 Moderate Yellowish Pink 0.7yr 7.2 4.9 #EE9374

30 Dark Yellowish Pink 7.0r 6.0 6.1 #CC6C5C

31 Pale Yellowish Pink 4.2yr 8.6 2.2 #FFC8A8

32 Grayish Yellowish Pink 1.3yr 7.2 2.4 #D39B85

Reddish Orange, Reddish Brown

33 Brownish Pink 7.0yr 7.1 2.3 #CD9A7B

34 Vivid Reddish Orange 9.8r 5.4 14.5 #F13A13

35 Strong Reddish Orange 9.3r 5.4 12.2 #FFB961

36 Deep Reddish Orange 9.2r 3.9 12.1 #A91D11

37 Moderate Reddish Orange 9.3r 5.5 9.2 #D35339

38 Dark Reddish Orange 9.3r 4.0 9.1 #9B2F1F

39 Grayish Reddish Orange 0.4yr 5.4 6.2 #B85D43

40 Strong Reddish Brown 0.3yr 3.1 9.9 #7F180D

41 Deep Reddish Brown 1.6yr 1.5 8.3 #490005

42 Light Reddish Brown 0.5yr 5.5 4.1 #AA6651

43 Moderate Reddish Brown 9.0r 3.4 5.2 #712F26

44 Dark Reddish Brown 9.6r 1.3 3.6 #321011

45 Light Grayish Reddish Brown 2.9yr 5.4 2.3 #966A57

46 Grayish Reddish Brown 9.0r 3.4 2.4 #5E3830

47 Dark Grayish Reddish Brown 9.0r 2.0 2.0 #371F1C

Orange Brown

48 Vivid Orange 4.1yr 6.5 15.0 #FF6800

49 Brilliant Orange 4.0yr 9.0 12.0 #FFB841

50 Strong Orange 4.3yr 6.5 12.2 #FF6F1A

51 Deep Orange 4.1yr 5.1 11.3 #C34D0A

52 Light Orange 4.8yr 7.8 7.2 #FFA161

53 Moderate Orange 4.6yr 6.5 8.2 #E8793E

54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B

Orange Yellow, Yellowish Brown

66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F

Yellow, Olive Brown

82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F



85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112
Greenish Yellow, Olive		
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910

Yellow Green, Olive Green

115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00
---------------------------	----------------	---------



116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931
Yellowish Green		
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712
Green		
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27



147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513

Bluish Green

158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7

Greenish Blue

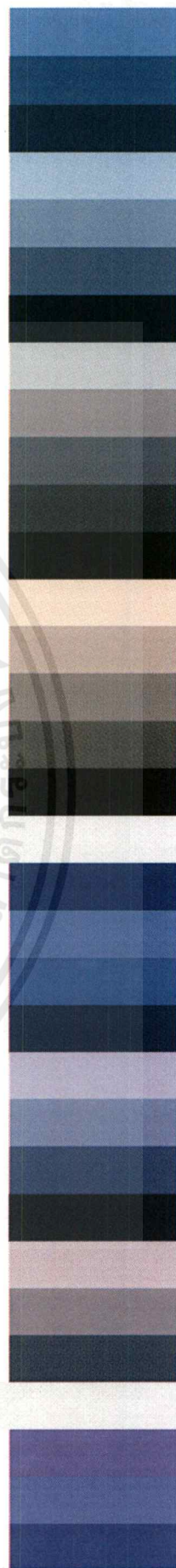
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027

Blue

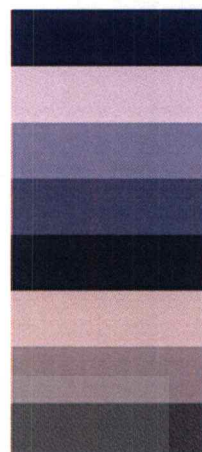
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD
----------------	---------------	---------



177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719
Purplish Blue		
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51
Violet		
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A



208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B



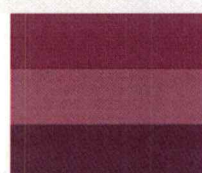
Purple

216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116



Reddish Purple

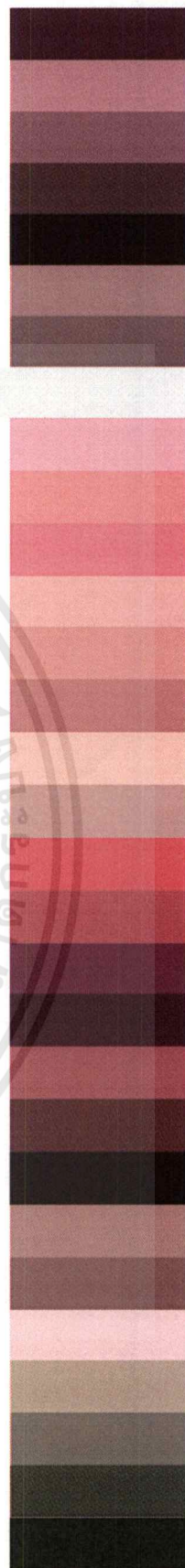
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349



239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D

Purplish Pink, Purplish Red

246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313



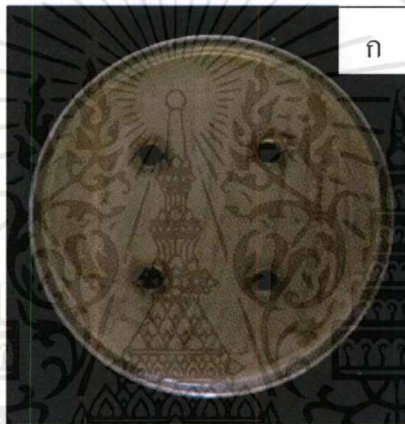
ภาคผนวก ง

ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี

Agar well diffusion

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากน้ำหมักของเชื้อแอสคิโนมัยซีทา

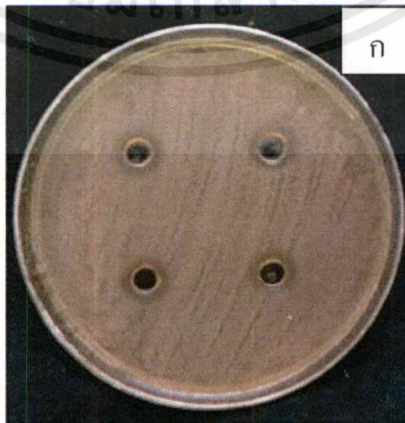
ไอโซเลต BK5-11 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร



รูปที่ ง1 (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

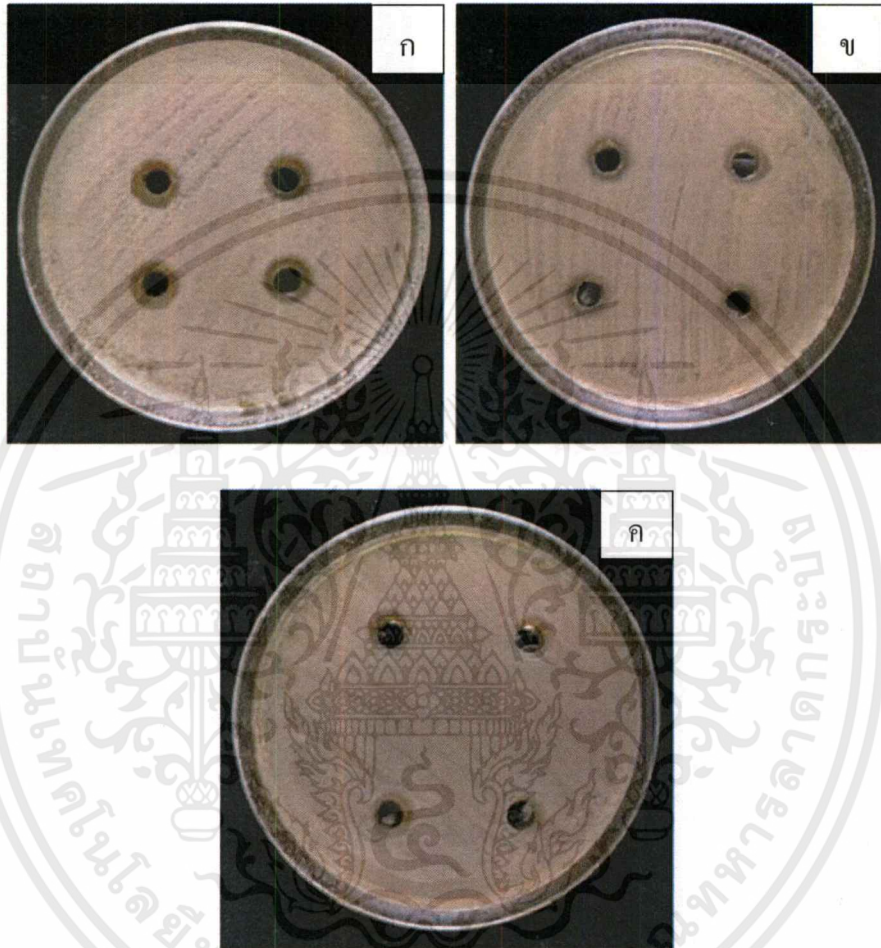
ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากน้ำหมักของเชื้อแอสคิโนมัยซีทา

ไอโซเลต BK9 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร



รูปที่ ง2 (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากน้ำหมักของเชื้อแอสคิตินอสีท
ไอโซเลต G17 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร



รูปที่ 33 (ก) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(ข) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

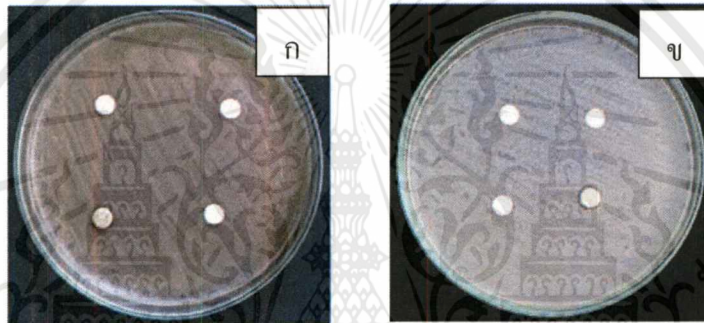
(ค) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ภาคผนวก จ

ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยวิธี

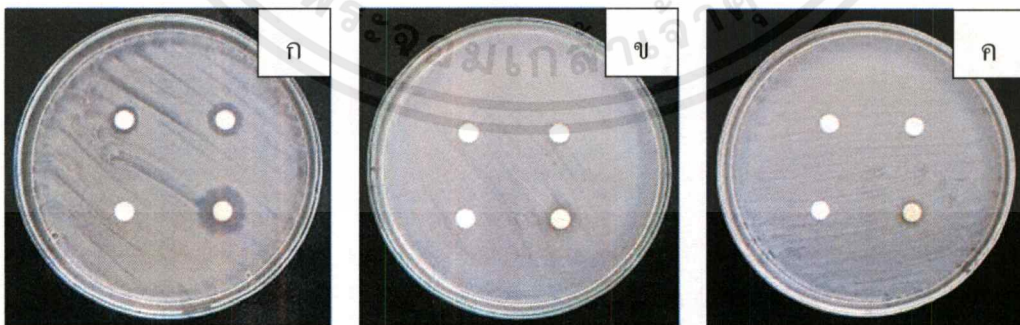
Agar disc diffusion

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอสคิโนมัซีทีไอโซเลต KL-B-2-11 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 µg/ml



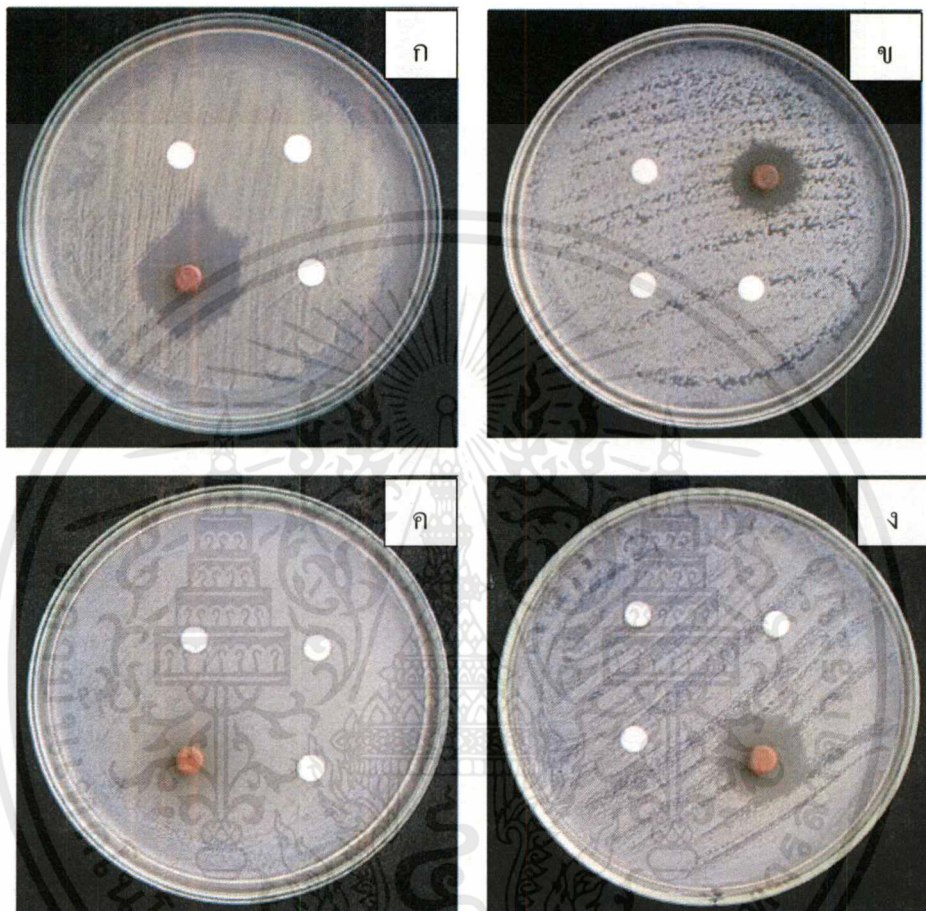
- รูปที่ ๑1 (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml
(ข) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอสคิโนมัซีทีไอโซเลต KL-B-3-3 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 µg/ml



- รูปที่ ๑2 (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 µg/ml
(ข) เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20654 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml
(ค) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-1 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 μ g/ml



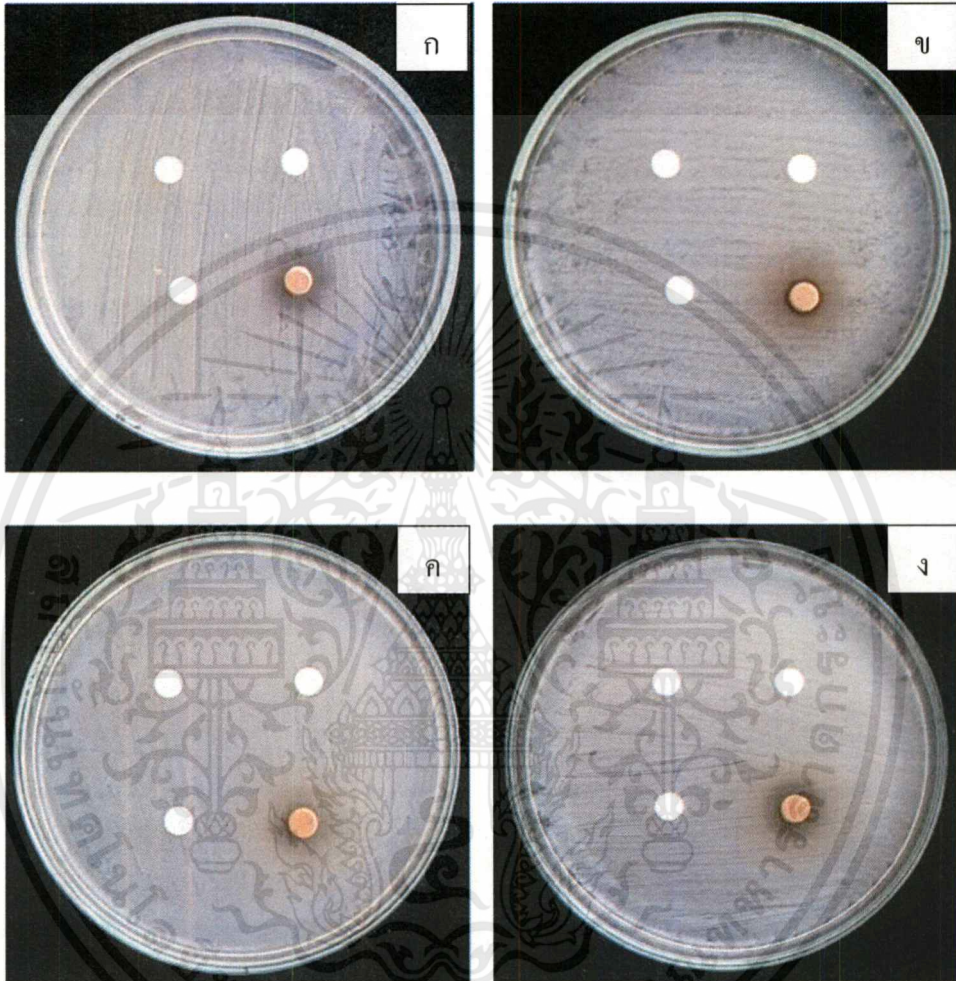
รูปที่ ๓ (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ข) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ค) เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20654 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ง) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-2 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 µg/ml



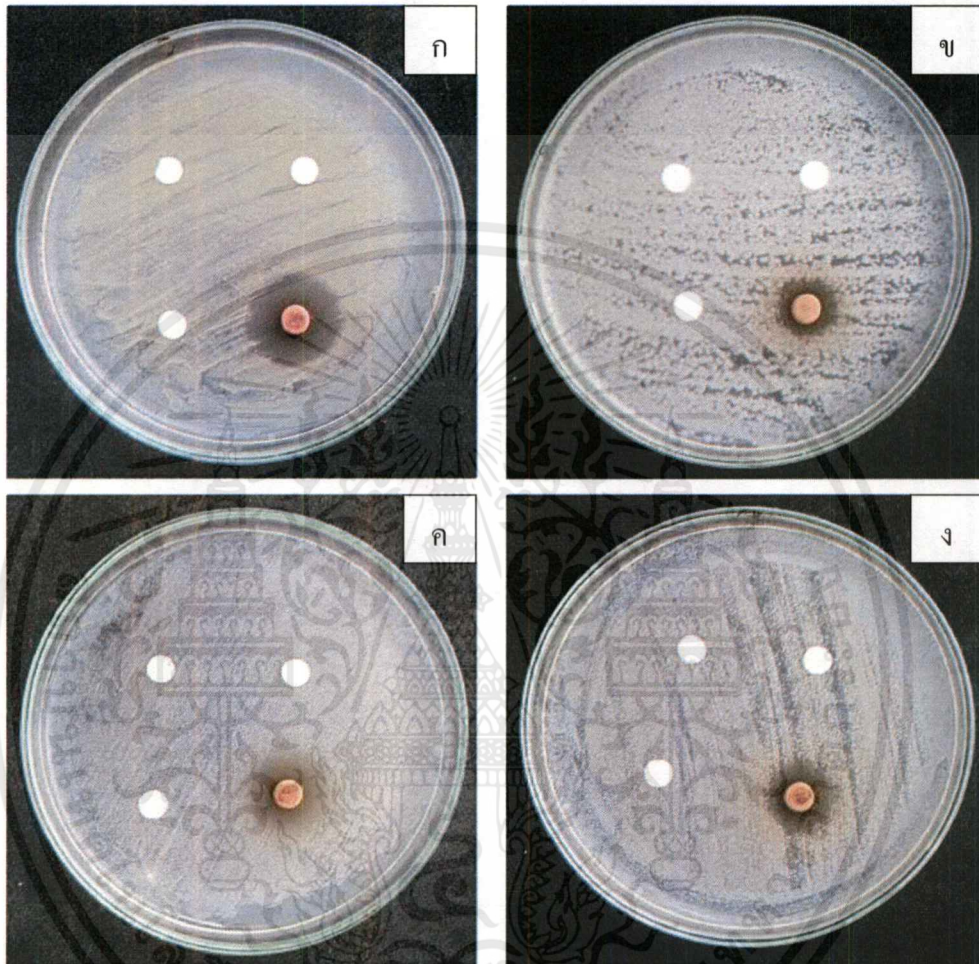
รูปที่ ๑๔ (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ข) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ค) เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20654 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml (ง)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-7 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 µg/ml



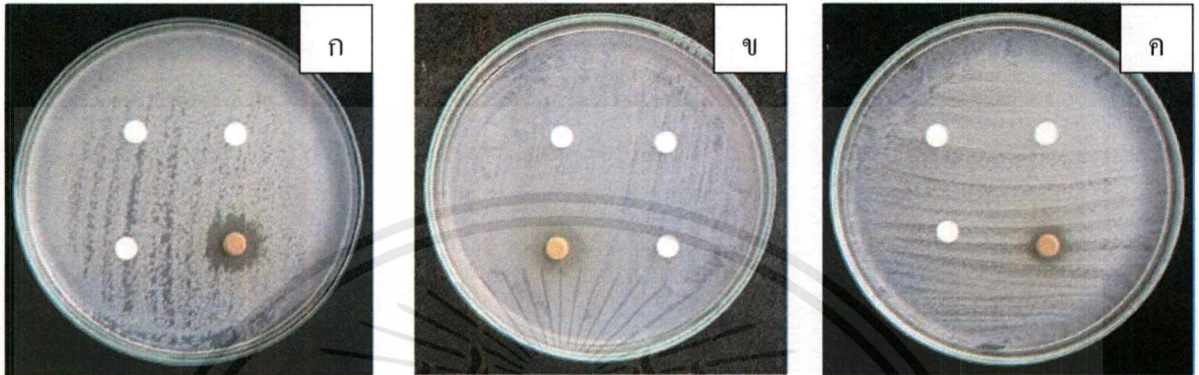
รูปที่ ๑๕ (ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ข) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ค) เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20654 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ง) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BK2-7 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml 1 mg/ml และ 500 μ g/ml



รูปที่ ๑๖ (ก) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ข) เชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20654 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

(ค) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

ภาคผนวก ฉ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KL-A-5-2 (800 นิวคลีโอไทด์)

GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAC
GGGGTCTAATACCGGATACTGACCACTGGGGGCATCCTCGGTGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGC
AGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAA
GAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAA
CCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTA
AGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KL-B-2-11 (790 นิวคลีโอไทด์)

AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTC
TAATACCGGATAACACTGCGGACCGCATGGTCTGCGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGA
GCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGC
CTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT
TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTAACCCCGGG
TCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG
GTGGGCACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCC
CGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KL-B-3-3 (750 นิวคลีโอไทด์)

CTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGG
GAAACCGGGCTAATACCGAATATGACCTCCGATCGCATGGTTGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGG
CCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCTACCAAGGCGACGACG
GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG
ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCA
GAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGACCGTGAAACCTGGGGCT
CAACCCAGGCCTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCC
GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGCAGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK1-2 (640 นิวคลีโอไทด์)

AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAA
CGGGGTCTAATACCGGATACGACGCGCTCGGGCATCCGATGTGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTG
AAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGA
AGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTGCGTCCGATGTGAAAGCCCGGGGCTTA
ACCCCGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT
TACTGACGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK1-4 (680 นิวคลีโอไทด์)

GGTGAATAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAAT
ACCGGATAGGACCTTCGGACGCATGCTCTGGGGTGGAAAGTTTTTCGGCTGGGATGGGCTCG
CGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGT
AAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTGCACCGTGAACACTTGGGGCTCAACCCCAAGCCTGC
GGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK2-1 (210 นิวคลีโอไทด์)

ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCCC
GGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACGCACTCTCGCATGGGATGTGTGTGAAAGTTTTTC
GGTTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGA
CGGGTAACCGGCCTGAGAGGG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK2-2 (640 นิวคลีโอไทด์)

CGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCCCGGGAAACT
GGGTCTAATACCGGATATGACCAGCCTCCGCATGGTGTGTTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGG
GATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAA
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAC
GGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCTAACGTGACGGTACCTGCAGAAGA
AGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGTGCGTAAAGCCCACGGCTTAACT
GTGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGACTAGAGGCAGGTAGGGGAGAATGGAATTCGGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCTGTAC
TGACGCTGAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK2-7 (721 นิวคลีโอไทด์)

GAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCA
GCCTCCGCATGGTGTGTTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCT
TGTTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAACCGGCCTGAGAGGGCGACCGGTC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAAT
GGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTT
TCAGCAGGGACGAAGCTAACGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG
GCGGTTTGTGCGCTCTGTGCGTAAAGCCACGGCTTAACTGTGGGTCTGCGGTGGATACGGGC
AGACTAGAGGCAGGTAGGGGAGAATGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGG
GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGG
GTTCTTCCACGGATTCCGCGCCGTAGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK5-11 (749 นิวคลีโอไทด์)

CGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGAATAGGACCTGGCCTCGCATGAGGTTTGGTGGAAAGTTTTTCGGCTGGG
ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTACGGTACCTGCAGAAGAA
GCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTGACTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTG
CGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTCTCCGTTCCCTGTGCCGCAGCTAACGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BK9 (441 นิวคลีโอไทด์)

CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGG
TCTAATACCGGATATGAGCCTGGACTGCATGGTCTGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGAT
GGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGC
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTGACAGGGACGAAGCGCAAGTACGGTACCTGTAGAAGAAGC
ACGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต G17 (731 นิวคลีโอไทด์)

TGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATAC
CGGATACGACCTCCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCG
CGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
AGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGAGAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT

AAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGC
 ATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGG
 AACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต G20-4 (591 นิวคลีโอไทด์)

TAACACGTGGGTGATCTGCCTCGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGA
 TATGACTTCTGGTTCGCATGGCTGGGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCCCGCGGCC
 TATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
 TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
 AACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGA
 GCTTGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGTGAAAACCTCACAGCTCAACTGTGAGCTTGCAGGCG
 ATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA
 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต NON6-2 (661 นิวคลีโอไทด์)

CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTA
 ATACCGAATATGACCTCCGATCGCATGGTTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCT
 CGCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
 AGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
 GGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
 GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG
 CCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGC
 GTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTTCGACCGTGAACCTGGGGCTCAACCCAGGCCT
 GCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTG
 AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT

ภาคผนวก ข

ระดับความคล้ายคลึงของนิเวศวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เด็กมหาวิทยาลัย

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต KL-A-5-2 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Streptomyces*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 KL-A-5-2	100	98.7	98.7	98.6	98.7	98.8	99.6	99.1	98.7	99.3	99.6	98.8	98.9	98.9	98.4	98.7	98.9	98.7	99.3	98.8	98.9
2 <i>Streptomyces violaceus</i>	98.7	100	99.4	99.1	100	98.4	98.8	99.3	98.9	98.7	98.8	98.4	98.8	98.8	98.4	98.6	98.8	98.6	98.8	99.2	99.1
3 <i>Streptomyces tuus</i>	98.7	99.4	100	99.1	99.4	98.7	98.8	99.6	98.9	98.7	98.8	98.2	98.8	98.8	98.7	98.8	98.8	98.8	98.8	98.7	98.8
4 <i>Streptomyces thinghirensis</i>	98.6	99.1	99.1	100	99.1	98.9	98.8	98.9	99.3	98.7	98.8	98.2	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.8	99.1	98.9
5 <i>Streptomyces roseoviolaceus</i>	98.7	100	99.4	99.1	100	98.4	98.8	99.3	98.9	98.7	98.8	98.4	98.8	98.8	98.4	98.6	98.8	98.6	98.8	99.2	99.1
6 <i>Streptomyces paradoxus</i>	98.8	98.4	98.7	98.9	98.4	100	98.9	98.8	99.1	98.8	98.9	98.1	99.6	99.6	99.2	99.6	99.6	99.6	98.7	98.3	98.4
7 <i>Streptomyces massasporeus</i>	99.6	98.8	98.8	98.8	98.8	98.9	100	99.2	98.9	99.7	100	98.7	99.1	99.1	98.7	98.8	99.1	98.8	99.7	99.1	99.2
8 <i>Streptomyces luteogriseus</i>	99.1	99.3	99.6	98.9	99.3	98.8	99.2	100	98.8	99.1	99.2	98.6	98.7	98.7	98.6	98.7	98.7	98.7	99.2	98.8	98.9
9 <i>Streptomyces levis</i>	98.7	98.9	98.9	99.3	98.9	99.1	98.9	98.8	100	98.8	98.9	98.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	98.7	98.9	99.1
10 <i>Streptomyces indiaensis</i>	99.3	98.7	98.7	98.7	98.7	98.8	99.7	99.1	98.8	100	99.7	98.7	98.9	98.9	98.6	98.9	98.9	98.9	99.4	98.8	98.9
11 <i>Streptomyces hawaiiensis</i>	99.6	98.8	98.8	98.8	98.8	98.9	100	99.2	98.9	99.7	100	98.7	99.1	99.1	98.7	98.8	99.1	98.8	99.7	99.1	99.2
12 <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	98.8	98.4	98.2	98.2	98.4	98.1	98.7	98.6	98.2	98.7	98.7	100.0	98.2	98.2	97.7	97.9	98.2	97.9	98.6	98.6	98.7
13 <i>Streptomyces coeruleus</i>	98.9	98.8	98.8	99.1	98.8	99.6	99.1	98.7	99.2	98.9	99.1	98.2	100	100	99.1	99.7	100	99.7	98.8	98.7	98.8
14 <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	98.9	98.8	98.8	99.1	98.8	99.6	99.1	98.7	99.2	98.9	99.1	98.2	100	100	99.1	99.7	100	99.7	98.8	98.7	98.8
15 <i>Streptomyces capillispiralis</i>	98.4	98.4	98.7	99.1	98.4	99.2	98.7	98.6	99.2	98.6	98.7	97.7	99.1	99.1	100	99.1	99.1	99.1	98.4	98.4	98.6
16 <i>Streptomyces caelestis</i>	98.7	98.6	98.8	99.1	98.6	99.6	98.8	98.7	99.2	98.9	98.8	97.9	99.7	99.7	99.1	100	99.7	100.0	98.6	98.4	98.6
17 <i>Streptomyces bellus</i>	98.9	98.8	98.8	99.1	98.8	99.6	99.1	98.7	99.2	98.9	99.1	98.2	100	100	99.1	99.7	100	99.7	98.8	98.7	98.8
18 <i>Streptomyces azureus</i>	98.7	98.6	98.8	99.1	98.6	99.6	98.8	98.7	99.2	98.9	98.8	97.9	99.7	99.7	99.1	100	99.7	100	98.6	98.4	98.6
19 <i>Streptomyces arenae</i>	99.3	98.8	98.8	98.8	98.8	98.7	99.7	99.2	98.7	99.4	99.7	98.6	98.8	98.8	98.4	98.6	98.8	98.8	100	99.1	99.2
20 <i>Streptomyces africanus</i>	98.8	99.2	98.7	99.1	99.2	98.3	99.1	98.8	98.9	98.8	99.1	98.6	98.7	98.7	98.4	98.4	98.7	98.4	99.1	100	99.8
21 <i>Streptomyces afghanensis</i>	98.9	99.1	98.8	98.9	99.1	98.4	99.2	98.9	99.1	98.9	99.2	98.7	98.8	98.8	98.6	98.6	98.8	98.6	99.2	99.8	100

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต BK1-2 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Streptomyces*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15.0	16	17	18	19	20	21
1 BK1-2	100	97.8	97.6	99.8	97.1	97.8	99.3	97.9	97.0	100	99.5	100	97.3	99.2	98.1	98.2	99.0	97.8	97.3	99.2	97.6
2 <i>Streptomyces asterosporus</i>	97.8	100	99.8	97.6	95.4	96.4	97.3	97.4	95.6	97.8	97.3	97.8	95.6	97.1	96.4	97.4	97.0	100	95.6	97.1	99.8
3 <i>Streptomyces virens</i>	97.6	99.8	100	97.4	95.3	96.2	97.1	97.3	95.4	97.6	97.1	97.6	95.4	97.0	96.2	97.3	96.8	99.8	95.4	97.0	100
4 <i>Streptomyces torulosus</i>	99.8	97.6	97.4	100	97.0	97.8	99.2	97.8	97.1	99.8	99.3	99.8	97.1	99.0	97.9	98.1	98.9	97.6	97.1	99.0	97.4
5 <i>Streptomyces tauricus</i>	97.1	95.4	95.3	97.0	100	97.6	97.1	96.7	97.6	97.1	96.7	97.1	99.8	97.1	97.4	97.0	96.8	95.4	99.3	97.1	95.3
6 <i>Streptomyces stelliscabiei</i>	97.8	96.4	96.2	97.8	97.6	100	97.8	97.6	97.1	97.8	97.3	97.8	97.8	97.9	99.0	96.7	97.6	96.4	97.8	97.9	96.2
7 <i>Streptomyces scabiei</i>	99.3	97.3	97.1	99.2	97.1	97.8	100	97.9	96.8	99.3	98.9	99.3	97.3	99.8	98.1	97.8	99.6	97.3	97.3	99.8	97.1
8 <i>Streptomyces roseollacinus</i>	97.9	97.4	97.3	97.8	96.7	97.6	97.9	100	96.0	97.9	97.8	97.9	96.8	97.8	97.9	97.3	97.6	97.4	96.8	97.8	97.3
9 <i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	97.0	95.6	95.4	97.1	97.6	97.1	96.8	96.0	100	97.0	96.5	97.0	97.4	96.8	97.3	96.0	96.5	95.6	97.3	96.8	95.4
10 <i>Streptomyces neyagawaensis</i>	100	97.8	97.6	99.8	97.1	97.8	99.3	97.9	97.0	100	99.5	100	97.3	99.2	98.1	98.2	99.0	97.8	97.3	99.2	97.6
11 <i>Streptomyces ipomoeae</i>	99.5	97.3	97.1	99.3	96.7	97.3	98.9	97.8	96.5	99.5	100	99.5	96.8	98.7	97.6	97.8	98.5	97.3	96.8	98.7	97.1
12 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>ossamyeticus</i>	100	97.8	97.6	99.8	97.1	97.8	99.3	97.9	97.0	100	99.5	100	97.3	99.2	98.1	98.2	99.0	97.8	97.3	99.2	97.6
13 <i>Streptomyces humidus</i>	97.3	95.6	95.4	97.1	99.8	97.8	97.3	96.8	97.4	97.3	96.8	97.3	100	97.3	97.6	97.1	97.0	95.6	99.5	97.3	95.4
14 <i>Streptomyces europaeiscabiei</i>	99.2	97.1	97.0	99.0	97.1	97.9	99.8	97.8	96.8	99.2	98.7	99.2	97.3	100	98.2	97.6	99.5	97.1	97.3	100	97.0
15 <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	98.1	96.4	96.2	97.9	97.4	99.0	98.1	97.9	97.3	98.1	97.6	98.1	97.6	98.2	100	97.0	97.8	96.4	97.6	98.2	96.2
16 <i>Streptomyces decoyicus</i>	98.2	97.4	97.3	98.1	97.0	96.7	97.8	97.3	96.0	98.2	97.8	98.2	97.1	97.6	97.0	100	97.4	97.4	97.3	97.6	97.3
17 <i>Streptomyces decanensis</i>	99.0	97.0	96.8	98.9	96.8	97.6	99.6	97.6	96.5	99.0	98.5	99.0	97.0	99.5	97.8	97.4	100	97.0	97.0	99.5	96.8
18 <i>Streptomyces calvus</i>	97.8	100	99.8	97.6	95.4	96.4	97.3	97.4	95.6	97.8	97.3	97.8	95.6	97.1	96.4	97.4	97.0	100	95.6	97.1	99.8
19 <i>Streptomyces cacaoi</i> subsp. <i>asoensis</i>	97.3	95.6	95.4	97.1	99.3	97.8	97.3	96.8	97.3	97.3	96.8	97.3	99.5	97.3	97.6	97.3	97.0	95.6	100	97.3	95.4
20 <i>Streptomyces bottropensis</i>	99.2	97.1	97.0	99.0	97.1	97.9	99.8	97.8	96.8	99.2	98.7	99.2	97.3	100	98.2	97.6	99.5	97.1	97.3	100	97.0
21 <i>Streptomyces aureorectus</i>	97.6	99.8	100	97.4	95.3	96.2	97.1	97.3	95.4	97.6	97.1	97.6	95.4	97.0	96.2	97.3	96.8	99.8	95.4	97.0	100

คำอธิบายระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต G17 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Streptomyces*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1 G17	100	98.7	98.9	99.0	99.5	99.1	98.7	99.5	99.4	99.5	99.5	99.5	99.0	99.5	99.1	99.0	99.5	99.7	98.9	99.8	99.8	
2 <i>Streptomyces albiflavivirger</i>	98.7	100	98.6	99.4	98.7	98.2	99.4	98.4	98.6	98.7	98.7	98.7	98.0	98.7	98.7	99.0	98.4	98.6	98.7	98.6	98.6	98.6
3 <i>Streptomyces youssoufiensis</i>	98.9	98.6	100	98.6	99.3	98.3	99.0	99.0	99.1	99.3	99.3	99.3	98.4	99.3	99.0	99.3	99.0	99.1	98.6	99.0	99.0	99.0
4 <i>Streptomyces varsoviensis</i>	99.0	99.4	98.6	100	98.7	98.3	99.1	98.7	98.6	98.7	98.7	98.7	98.2	98.7	99.0	99.0	98.7	98.9	98.7	98.9	98.9	98.9
5 <i>Streptomyces tubercidicus</i>	99.5	98.7	99.3	98.7	100	99.0	98.9	99.7	99.8	100.0	100	100	98.9	100	99.1	99.1	99.7	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
6 <i>Streptomyces siyuanensis</i>	99.1	98.2	98.3	98.3	99.0	100	98.2	98.9	98.9	99.0	99.0	99.0	99.7	99.0	98.4	98.4	98.9	99.0	98.0	99.0	99.0	99.0
7 <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	98.7	99.4	99.0	99.1	98.9	98.2	100	98.6	98.7	98.9	98.9	98.9	98.3	98.9	98.6	99.4	98.6	98.7	99.0	98.6	98.6	98.6
8 <i>Streptomyces ramulosus</i>	99.5	98.4	99.0	98.7	99.7	98.9	98.6	100	99.5	99.7	99.7	99.7	98.7	99.7	99.1	98.9	100	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
9 <i>Streptomyces platenis</i>	99.4	98.6	99.1	98.6	99.8	98.9	98.7	99.5	100	99.8	99.8	99.8	98.7	99.8	99.0	99.0	99.5	99.7	98.6	99.5	99.5	99.5
10 <i>Streptomyces nigrescens</i>	99.5	98.7	99.3	98.7	100	99.0	98.9	99.7	99.8	100	100	100	98.9	100	99.1	99.1	99.7	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
11 <i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i>	99.5	98.7	99.3	98.7	100	99.0	98.9	99.7	99.8	100	100	100	98.9	100	99.1	99.1	99.7	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
12 <i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>libani</i>	99.5	98.7	99.3	98.7	100	99.0	98.9	99.7	99.8	100	100	100	98.9	100	99.1	99.1	99.7	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
13 <i>Streptomyces kasugaensis</i>	99.0	98.0	98.4	98.2	98.9	99.7	98.3	98.7	98.7	98.9	98.9	98.9	100	98.9	98.3	98.6	98.7	98.9	98.2	98.9	98.9	98.9
14 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	99.5	98.7	99.3	98.7	100	99.0	98.9	99.7	99.8	100	100	100	98.9	100.0	99.1	99.1	99.7	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
15 <i>Streptomyces griseocarneus</i>	99.1	98.7	99.0	99.0	99.1	98.4	98.6	99.1	99.0	99.1	99.1	99.1	98.3	99.1	100	99.1	99.1	99.3	98.6	99.3	99.3	99.3
16 <i>Streptomyces coeruleus</i>	99.0	99.0	99.3	99.0	99.1	98.4	99.4	98.9	99.0	99.1	99.1	99.1	98.6	99.1	99.1	100	98.9	99.0	98.7	98.9	98.9	98.9
17 <i>Streptomyces catenulae</i>	99.5	98.4	99.0	98.7	99.7	98.9	98.6	100	99.5	99.7	99.7	99.7	98.7	99.7	99.1	98.9	100	99.8	98.7	99.7	99.7	99.7
18 <i>Streptomyces caniferus</i>	99.7	98.6	99.1	98.9	99.8	99.0	98.7	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	98.9	99.8	99.3	99.0	99.8	100	98.9	99.8	99.8	99.8
19 <i>Streptomyces ascomycinicus</i>	98.9	98.7	98.6	98.7	98.7	98.0	99.0	98.7	98.6	98.7	98.7	98.7	98.2	98.7	98.6	98.7	98.7	98.9	100	99.0	99.0	99.0
20 <i>Streptomyces angustimycinicus</i>	99.8	98.6	99.0	98.9	99.7	99.0	98.6	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	98.9	99.7	99.3	98.9	99.7	99.8	99.0	100	100	100
21 <i>Streptomyces angustimycinicus</i>	99.8	98.6	99.0	98.9	99.7	99.0	98.6	99.7	99.5	99.7	99.7	99.7	98.9	99.7	99.3	98.9	99.7	99.8	99.0	100.0	100	100

คำอธิบายระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไฮโซเดต BK2-1 BK2-2 และ BK2-7 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Actinomadura*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 BK2-1	100	94.4	94.4	99.4	93.8	91.6	93.3	93.3	92.2	94.4	98.8	93.3	92.2	91.6	91.6	93.8	93.3	91.6	90.5	92.7	94.4	91.6	91.1	93.3
2 BK2-7	94.4	100	100	93.8	99.4	93.3	96.1	96.1	94.4	95.5	93.3	95.0	93.8	93.8	93.8	95.0	96.1	93.8	94.4	95.0	97.2	93.8	93.3	98.8
3 BK2-2	94.4	100	100	93.8	99.4	93.3	96.1	96.1	94.4	95.5	93.3	95.0	93.8	93.8	93.8	95.0	96.1	93.8	94.4	95.0	97.2	93.8	93.3	98.8
4 <i>Actinomadura madurae</i>	99.4	93.8	93.8	100	93.3	91.1	92.7	92.7	91.6	93.8	98.3	92.7	92.7	91.1	91.1	94.4	92.7	91.1	90.0	92.2	93.8	91.1	91.6	92.7
5 <i>Actinomadura bangladeshensis</i>	93.8	99.4	99.4	93.3	100	92.7	96.6	96.6	93.8	96.1	93.8	94.4	93.3	93.3	93.3	95.5	95.5	93.3	95.0	94.4	96.6	93.3	92.7	99.4
6 <i>Actinomadura yunnanensis</i>	91.6	93.3	93.3	91.1	92.7	100	93.8	94.4	96.1	92.2	91.6	96.1	97.2	96.6	96.6	91.1	95.0	96.6	93.3	92.7	95.0	95.5	95.5	92.2
7 <i>Actinomadura viridis</i>	93.3	96.1	96.1	92.7	96.6	93.8	100	97.7	95.0	95.0	93.3	96.1	94.4	94.4	94.4	93.8	96.6	94.4	93.3	94.4	98.8	94.4	93.8	96.1
8 <i>Actinomadura vinacea</i>	93.3	96.1	96.1	92.7	96.6	94.4	97.7	100	96.1	96.6	93.3	96.6	95.5	95.5	95.5	93.3	96.1	95.5	94.4	94.4	96.6	95.5	94.4	96.1
9 <i>Actinomadura verrucosopora</i>	92.2	94.4	94.4	91.6	93.8	96.1	95.0	96.1	100	92.7	91.1	97.7	96.6	98.3	98.3	90.5	95.5	98.3	93.3	94.4	96.1	99.4	97.2	93.3
10 <i>Actinomadura rugatobipora</i>	94.4	95.5	95.5	93.8	96.1	92.2	95.0	96.6	92.7	100	94.4	93.3	92.2	92.2	92.2	93.3	93.8	92.2	94.4	92.7	93.8	92.2	92.2	92.2
11 <i>Actinomadura rubidentiformis</i>	98.8	93.3	93.3	98.3	93.8	91.6	93.3	93.3	91.1	94.4	100	92.2	91.1	90.5	90.5	95.0	93.3	90.5	91.6	91.6	93.3	90.5	90.0	93.3
12 <i>Actinomadura nitritigenes</i>	93.3	95.0	95.0	92.7	94.4	96.1	96.1	96.6	97.7	93.3	92.2	100	96.6	96.1	96.1	91.6	96.1	96.1	92.7	94.4	97.2	97.2	95.0	93.8
13 <i>Actinomadura mexicana</i>	92.2	93.8	93.8	92.7	93.3	97.2	94.4	95.5	96.6	92.2	91.1	96.6	100	97.2	97.2	91.6	94.4	97.2	92.2	93.8	95.5	96.1	97.2	92.7
14 <i>Actinomadura maheshkhalensis</i>	91.6	93.8	93.8	91.1	93.3	96.6	94.4	95.5	98.3	92.2	90.5	96.1	97.2	100	100	90.0	95.0	100	92.7	93.8	95.5	97.7	97.7	92.7
15 <i>Actinomadura luteofluorescens</i>	91.6	93.8	93.8	91.1	93.3	96.6	94.4	95.5	98.3	92.2	90.5	96.1	97.2	100	100	90.0	95.0	100	92.7	93.8	95.5	97.7	97.7	92.7
16 <i>Actinomadura latina</i>	93.8	95.0	95.0	94.4	95.5	91.1	93.8	93.3	90.5	93.3	95.0	91.6	91.6	90.0	90.0	100	93.3	90.0	94.4	92.7	93.8	90.0	90.5	95.0
17 <i>Actinomadura kibica</i>	93.3	96.1	96.1	92.7	95.5	95.0	96.6	96.1	95.5	93.8	93.3	96.1	94.4	95.0	95.0	93.3	100	95.0	94.4	93.8	97.7	95.0	95.0	95.0
18 <i>Actinomadura glauciflora</i>	91.6	93.8	93.8	91.1	93.3	96.6	94.4	95.5	98.3	92.2	90.5	96.1	97.2	100	100	90.0	95.0	100	92.7	93.8	95.5	97.7	97.7	92.7
19 <i>Actinomadura fulvescens</i>	90.5	94.4	94.4	90.0	95.0	93.3	93.3	94.4	93.3	94.4	91.6	92.7	92.2	92.7	92.7	92.7	94.4	92.7	100	96.6	93.3	92.7	92.7	94.4
20 <i>Actinomadura formosensis</i>	92.7	95.0	95.0	92.2	94.4	92.7	94.4	94.4	94.4	92.7	91.6	94.4	93.8	93.8	93.8	92.7	93.8	93.8	96.6	100	95.5	93.8	93.3	93.8
21 <i>Actinomadura fibrosa</i>	94.4	97.2	97.2	93.8	96.6	95.0	98.8	96.6	96.1	93.8	93.3	97.2	95.5	95.5	95.5	93.8	97.7	95.5	93.3	95.5	100	95.5	95.0	96.1
22 <i>Actinomadura coerulea</i>	91.6	93.8	93.8	91.1	93.3	95.5	94.4	95.5	99.4	92.2	90.5	97.2	96.1	97.7	97.7	90.0	95.0	97.7	92.7	93.8	95.5	100	96.6	92.7
23 <i>Actinomadura citrea</i>	91.1	93.3	93.3	91.6	92.7	95.5	93.8	94.4	97.2	92.2	90.0	95.0	97.2	97.7	97.7	90.5	95.0	97.7	92.7	93.3	95.0	96.6	100	92.2
24 <i>Actinomadura chokriensis</i>	93.3	98.8	98.8	92.7	99.4	92.2	96.1	96.1	93.3	95.5	93.3	93.8	92.7	92.7	92.7	95.0	95.0	92.7	94.4	93.8	96.1	92.7	92.2	100

ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของเชื้อไฮโซเดต KL-B-3-3 BK1-4 BK5-11 และ NON6-2 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Micromonospora*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	NON6-2	100	97.3	100	98.0	100	100	97.6	98.4	96.9	99.6	96.0	97.0	99.5	96.7	98.0	97.5	99.2	97.0	97.3	98.7	96.9	97.2	97.3
2	BK5-11	97.3	100	97.3	96.1	97.3	95.8	97.5	99.5	97.0	98.6	99.0	99.0	96.9	98.9	96.1	95.3	97.0	96.7	98.7	96.9	95.0	95.0	98.9
3	KL-B-3-3	100	97.3	100	98.0	100	97.6	98.4	96.9	99.6	96.0	97.0	97.0	99.5	96.7	98.0	97.5	99.2	97.0	97.3	98.7	96.9	97.2	97.3
4	BK1-4	98.0	96.1	98.0	100	98.0	99.2	96.9	96.0	98.3	94.9	95.5	95.6	98.1	95.8	100	97.3	97.2	97.3	96.3	97.8	98.0	97.6	95.8
5	<i>Micromonospora sediminiticola</i>	100	97.3	100	98.0	100	97.6	98.4	96.9	99.6	96.0	97.0	97.0	99.5	96.7	98.0	97.5	99.2	97.0	97.3	98.7	96.9	97.2	97.3
6	<i>Micromonospora maritima</i>	100	97.3	100	98.0	100	97.6	98.4	96.9	99.6	96.0	97.0	97.0	99.5	96.7	98.0	97.5	99.2	97.0	97.3	98.7	96.9	97.2	97.3
7	<i>Micromonospora carbonacea</i>	97.6	95.8	97.6	99.2	97.6	100	96.6	96.0	98.0	94.6	95.5	95.6	98.1	96.1	99.2	97.3	97.3	97.3	95.8	98.0	97.5	97.6	95.5
8	<i>Micromonospora chalcona</i>	98.4	97.5	98.4	96.9	98.4	96.6	100	97.0	98.1	96.7	97.6	97.2	98.0	96.4	96.9	97.0	98.4	97.0	97.8	97.6	96.4	96.7	98.6
9	<i>Micromonospora chersina</i>	96.9	99.5	96.9	96.0	96.9	96.0	97.0	100	96.6	98.1	98.6	98.9	96.7	99.0	96.0	95.2	96.6	96.6	98.6	96.7	94.9	94.9	94.6
10	<i>Micromonospora coxensis</i>	99.6	97.0	99.6	98.3	99.6	98.0	98.1	96.6	100	95.6	96.7	96.7	99.8	96.4	98.3	97.8	98.9	97.3	97.0	99.0	97.2	97.5	97.0
11	<i>Micromonospora cremea</i>	96.0	98.6	96.0	94.9	96.0	94.6	96.7	98.1	95.6	100	98.3	97.6	95.5	97.5	94.9	96.1	96.3	96.0	97.3	95.5	94.4	95.8	98.1
12	<i>Micromonospora endolithica</i>	97.0	99.0	97.0	95.5	97.0	95.5	97.6	98.6	96.7	98.3	100	98.4	96.6	98.4	95.5	96.0	97.6	96.4	98.0	96.4	94.9	95.6	99.0
13	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	97.0	99.0	97.0	95.6	97.0	95.6	97.2	98.9	96.7	97.6	98.4	100	96.6	98.0	95.6	95.2	96.9	96.3	97.8	96.7	94.9	94.9	98.6
14	<i>Micromonospora halophytica</i>	99.5	96.9	99.5	98.1	99.5	98.1	98.0	96.7	99.8	95.5	96.6	96.6	100	96.6	98.1	97.6	98.7	97.2	96.9	99.2	97.0	97.3	96.9
15	<i>Micromonospora inositola</i>	96.7	98.9	96.7	95.8	96.7	96.1	96.4	99.0	96.4	97.5	98.4	98.0	96.6	100	95.8	95.2	96.6	96.1	98.0	96.6	94.4	94.6	97.8
16	<i>Micromonospora krabiensis</i>	98.0	96.1	98.0	100	98.0	99.2	96.9	96.0	98.3	94.9	95.5	95.6	98.1	95.8	100	97.3	97.2	97.3	96.3	97.8	98.0	97.6	95.8
17	<i>Micromonospora lupini</i>	97.5	95.3	97.5	97.3	97.5	97.3	97.0	95.2	97.8	96.1	96.0	95.2	97.6	95.2	97.3	100	98.0	97.2	95.6	98.1	96.6	99.3	96.0
18	<i>Micromonospora marina</i>	99.2	97.0	99.2	97.2	99.2	97.3	98.4	96.6	98.9	96.3	97.6	96.9	98.7	96.6	97.2	98.0	100	96.7	96.7	98.3	96.1	97.6	97.6
19	<i>Micromonospora matsumotoense</i>	97.0	96.7	97.0	97.3	97.0	97.3	97.0	96.6	97.3	96.0	96.4	96.3	97.2	96.1	97.3	97.2	96.7	100	96.4	97.5	97.2	97.5	96.0
20	<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	97.3	98.7	97.3	96.3	97.3	95.8	97.8	98.6	97.0	97.3	98.0	97.8	96.9	98.0	96.3	95.6	96.7	96.4	100	96.6	95.5	95.0	98.6
21	<i>Micromonospora purpleochromogenes</i>	98.7	96.9	98.7	97.8	98.7	98.0	97.6	96.7	99.0	95.5	96.4	96.7	99.2	96.6	97.8	98.1	98.3	97.5	96.6	100	96.7	97.8	96.6
22	<i>Micromonospora rifamycinica</i>	96.9	95.0	96.9	98.0	96.9	97.5	96.4	94.9	97.2	94.4	94.9	94.9	97.0	94.4	98.0	96.6	96.1	97.2	95.5	96.7	100	96.9	95.3
23	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	97.2	95.0	97.2	97.6	97.2	97.6	96.7	94.6	97.5	95.8	95.6	94.9	97.3	94.6	97.6	99.3	97.6	97.5	95.0	97.8	96.9	100	95.6
24	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	97.3	98.9	97.3	95.8	97.3	95.5	98.6	98.4	97.0	98.1	99.0	98.6	96.9	97.8	95.8	96.0	96.0	97.6	96.0	96.6	95.3	95.6	100

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อ โคโรนา BK9 และ G20-4 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Nocardia*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	G20-4	100	95.5	95.5	100	99.0	96.2	96.2	99.2	98.1	96.9	94.5	97.1	98.3	96.0	94.1	97.8	99.2	95.7	96.7	97.1	95.0
2	BK9	95.5	100	100	95.5	95.5	97.1	96.4	95.2	95.5	96.0	94.3	94.8	95.2	94.1	96.0	96.9	95.7	95.0	94.5	96.2	96.9
3	<i>Nocardia nigenensis</i>	95.5	100	100	95.5	97.1	96.4	95.0	95.2	98.1	96.9	94.3	94.8	95.2	94.1	96.0	96.9	95.7	95.0	94.5	96.2	96.9
4	<i>Nocardia beijingensis</i>	100	95.5	95.5	100	99.0	97.4	96.2	99.2	98.1	96.9	94.5	97.1	98.3	96.0	94.1	97.8	99.2	95.7	96.7	97.1	95.0
5	<i>Nocardia abcessus</i>	99.0	95.5	95.5	99.0	100	97.1	96.0	99.2	98.3	96.9	94.5	97.4	98.8	96.4	94.1	97.6	98.3	95.7	97.1	97.4	95.5
6	<i>Nocardia acidovorans</i>	96.2	97.1	97.1	96.2	96.0	100	96.0	95.5	96.7	96.0	94.8	94.5	96.2	94.1	97.4	97.1	96.2	96.0	95.2	96.4	96.9
7	<i>Nocardia almatirensis</i>	97.4	96.4	96.4	97.4	97.1	96.9	97.1	97.1	96.9	97.8	96.4	94.5	95.7	96.2	94.5	96.9	97.4	96.7	95.5	97.6	95.7
8	<i>Nocardia anserinae</i>	96.2	95.0	95.0	96.2	96.0	97.1	100	96.4	96.9	96.0	95.5	96.9	96.9	95.7	96.2	96.9	96.7	99.5	97.4	95.2	93.8
9	<i>Nocardia araucensis</i>	99.2	95.2	95.2	99.2	99.2	95.5	97.1	100	97.8	96.9	94.5	97.1	98.1	96.2	93.8	97.6	99.0	96.0	96.7	97.6	95.0
10	<i>Nocardia asteroides</i>	98.1	95.5	95.5	98.1	98.3	96.7	96.9	97.8	100	96.9	94.8	97.4	97.1	95.0	94.5	96.7	97.8	96.9	98.5	96.0	95.5
11	<i>Nocardia brasiliensis</i>	96.9	96.0	96.0	96.9	96.9	96.0	97.8	96.0	96.9	100	95.0	96.0	96.7	95.0	94.5	96.7	96.7	96.0	96.0	97.1	95.5
12	<i>Nocardia cuniculiformis</i>	94.5	94.3	94.3	94.5	94.5	94.8	95.5	94.5	94.8	95.0	100	93.6	94.3	93.4	95.7	95.2	94.5	95.0	94.1	94.5	95.0
13	<i>Nocardia farcinica</i>	97.1	94.8	94.8	97.1	97.4	94.5	95.7	97.1	97.4	96.0	93.6	100	96.2	96.9	92.7	96.7	96.4	96.9	98.3	95.5	94.1
14	<i>Nocardia gamkensis</i>	98.3	95.2	95.2	98.3	98.8	96.2	96.9	98.1	97.1	96.7	94.3	96.2	100	96.2	93.8	97.4	97.6	95.5	96.0	97.1	94.3
15	<i>Nocardia globetrotta</i>	96.0	94.1	94.1	96.0	96.4	94.1	95.5	96.2	95.0	95.0	93.4	96.9	96.2	100	92.2	96.4	95.2	95.7	95.7	95.2	92.7
16	<i>Nocardia jejuensis</i>	94.1	96.0	96.0	94.1	94.1	97.4	96.0	94.5	94.5	94.5	95.7	92.7	93.8	92.2	100	95.7	95.7	94.3	93.1	95.2	96.7
17	<i>Nocardia nova</i>	97.8	96.9	96.9	97.8	97.6	97.1	98.1	97.6	96.7	96.7	95.2	96.7	97.4	96.4	95.7	100	100	96.4	95.2	96.7	95.5
18	<i>Nocardia pneumoniae</i>	99.2	95.7	95.7	99.2	98.3	96.2	97.4	99.0	97.8	96.7	94.5	96.4	97.6	95.2	94.1	97.4	100	96.2	96.4	96.7	95.0
19	<i>Nocardia paratuberculosis</i>	95.7	95.0	95.0	95.7	95.7	96.0	96.7	99.5	96.0	96.0	95.0	96.9	95.5	95.7	94.3	96.4	96.4	100	97.4	94.8	93.8
20	<i>Nocardia rhinoflavescens</i>	96.7	94.5	94.5	96.7	97.1	95.2	95.5	96.7	98.5	96.0	94.1	98.3	96.0	95.7	93.1	95.2	96.4	97.4	100	94.8	94.3
21	<i>Nocardia ewersensis</i>	97.1	96.2	96.2	97.1	97.4	96.4	97.6	97.6	96.0	97.1	94.5	95.5	97.1	95.2	95.2	96.7	96.7	94.8	94.8	100	95.5
22	<i>Nocardia yamanashiensis</i>	95.0	96.9	96.9	95.0	95.5	96.9	95.7	95.0	95.5	95.5	95.0	94.1	94.3	92.7	96.7	96.7	95.5	93.8	94.3	95.5	100