สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ที่แยกจากดินบริเวณต้นข้าว

# IDENTIFICATION OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM RICE RHIZOSPHERE SOIL

วิภาวดี พรหมลิ
สุวภัทร์ ทองน้อย
เสาวณีย์ มาจันทร์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 141980
วัน,เดือน,ปี 11 เมย. 2559

b 12767840
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# IDENTIFICATION OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM RICE RHIZOSPHERE SOIL

WIPAWADEE PROMMALI
SUWAPAT THONGNOI
SAOWANEE MAJUN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ที่แยกจากดินบริเวณต้นข้าว

Identification of actinobacteria isolated from rice rhizosphere soil


**ชื่อนักศึกษา** นางสาว วิภาวดี พรหมลิ 54050444

นางสาว สุวภัทร์ ทองน้อย 54050460

นางสาว เสาวณีย์ มาจันทร์ 54050462


**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2557

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2557

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ. วีนา ชูโชติ<br>ประธานคณะกรรมการ | |
| ดร. ดวงกมล เรือนงาม<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |


ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ที่แยกจากดินบริเวณต้นข้าว<br>Identification of actinobacteria isolated from rice rhizosphere soil |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาววิภาวดี พรหมลิ 54050444<br>นางสาวสุวภัทร์ ทองน้อย 4050460<br>นางสาวเสาวณีย์ มาจันทร์ 54050462 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2557 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว |

## บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณต้นข้าว จำนวน 4 ไอโซเลต ถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้วิธีร่วมระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์ อนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA พบว่า เชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่ศึกษาเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces Actinomadura Amicrolatopsis* และ*Micromonospora* การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ไอโซเลต *45 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces panaciradicis* มากที่สุดด้วย (99.93%) ไอโซเลต PCWR-4-6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Actinomadura maheshkhaliesis* มากที่สุดด้วย (99.23%) ไอโซเลต DH51b-4-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Amycolatopsis dongchuanensis* มากที่สุดด้วย (98.06%) ไอโซเลต PN51B-9-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Micromonospora chaiyaphumensis* มากที่สุดด้วย (99.44%) จากการศึกษานี้แสดงว่า ไอโซเลต PCWR-4-6 DH51b-4-3 และ PN51B-9-4 ควรถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล Actinomadura, *Amycolatopsis* และ *Micromonospora* ตามลำดับ

**คำสำคัญ : แอคติโนแบคทีเรีย การพิสูจน์เอกลักษณ์ ดินบริเวณรากข้าว**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Title** Identification of actinobacteria isolated from rice rhizosphere soil

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Students** | Wipawadee | Prommali | 54050444 |
| | Suwapat | Thongnoi | 54050460 |
| | Saowanee | Majun | 54050462 |
| **Degree** | Faculty of Science | | |
| **Department** | Biology | | |
| **Academic Year** | 2014 | | |
| **Advisor** | Asst. Prof. Dr. Chitti Thawai | | |

## ABSTRACT

Four isolates of rice rhizosphere soil actinobacteria were identified using the procedure that combined of phenotypic, chemotaxonomic, and 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analyses. Actinobacteria belonging to a total of four genera *Streptomyces, Actinomadura, Amicrolatopsis* and *Micromonospora* were identified. Isolate *45 was closely relate to *Streptomyces panaciradicis* (99.93%). Isolate PCWR-4-6 was closely relate to *Actinomadura maheshkhaliesis* (99.23%). Isolate DH51b-4-3 was closely relate to *Amycolatopsis dongchuanensis* (98.06%). Isolate PN51B-9-4 was closely relate to *Micromonospora chaiyaphumensis* (99.44%). The result of this study exhibited that isolate PCWR-4-6, DH51b-4-3 and PN51B-9-4 should be judged as the novel species of the genera *Actinomadura*, *Amycolatopsis* and *Micromonospora*, respectively.

**Keywords :** Actinobacteria, Identification, Rice rhizosphere soil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้การช่วยเหลือ และให้คำแนะนำปรึกษาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ผศ. วีนา ชูโชติ ประธานคณะกรรมการ และดร. ดวงกมล เรือนงาม กรรมการที่ให้การช่วยเหลือ และให้คำแนะนำ ขอขอบพระคุณ นางสาวนันทวัน เนียมหอม ที่คอยให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้กำลังใจให้คำแนะนำปรึกษา และให้การช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณบิดา และมารดาที่ให้การเลี้ยงดู อบรม สั่งสอน และให้การศึกษา รวมทั้งคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณ ครู อาจารย์ ทุกๆ ท่าน ที่คอยอบรม สั่งสอน ให้ความรู้จนทำให้กลุ่มของข้าพเจ้ามีความรู้ความสามารถจนสามารถทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้สำเร็จ

นางสาววิภาวดี พรหมลิ
นางสาวสุวภัทร์ ทองน้อย
นางสาวเสาวณีย์ มาจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย.....ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญ (ต่อ).....จ

สารบัญตาราง.....ฉ

สารบัญรูป.....ช

คำย่อและสัญลักษณ์.....ซ

**บทที่ 1 บทนำ.....1**

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....1

**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....2**

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย.....2

2.2 นิเวศวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย.....3

2.3 สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย.....4

2.4 การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย.....10

2.5 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย.....15

2.6 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก.....21

2.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย.....28

2.8 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย.....41

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....47

**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....53**

**การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท**

3.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....53

3.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์.....53

3.3 การศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์.....56

3.4 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์.....59

**บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....63**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ....82
เอกสารอ้างอิง....83
ภาคผนวก ก....86
ภาคผนวก ข....96
ภาคผนวก ค....103
ภาคผนวก ง....106
ภาคผนวก จ....117
ภาคผนวก ฉ....124
ภาคผนวก ช....129

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

หน้า

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย.....11
2.2 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สำคัญ.....13
2.3 ค่าร้อยละของสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อที่อยู่รอดเมื่อแยกด้วยเทคนิคการใช้สารเคมี.....24
2.4 วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน.....27
2.5 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....33
2.6 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมาก (major) ในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ.....34
2.7 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศ ซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso*.....34
2.8 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย.....36
2.9 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีท.....37
2.10 เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ.....45
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....60
3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles).....60
3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene.....61
3.4 โปรแกรม Big dye.....62
4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....75
4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....75
4.3 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต.....76
4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาศึกษา.....77
4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาศึกษา.....77
4.6 แสดงองค์ประกอบของไขมันชนิดมีขั้วของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

หน้า

2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง....4
2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว....5
2.3 ลักษณะสปอร์เป็นสาย....6
2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*....8
2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร....9
2.6 รูปทรงของอับสปอร์....10
2.7 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาส Actinobacteria โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene....15
2.8 ลูไซท์ เพลท....25
2.9 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน....32
2.10 โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย....37
2.11 โครงสร้างของกรดมัยคอลิก....38
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต *45....64
4.2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต *45 บน phylogenetic tree....65
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3....67
4.4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 บน phylogenetic tree....68
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6....70
4.6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree....71
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4....73
4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4 บน phylogenetic tree....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำย่อและสัญลักษณ์

aw = water activity
w/v = น้ำหนักต่อปริมาตร
PS = Phosphatidylserine
pmol/µl = พิโคโมลต่อไมโครลิตร
mM = มิลลิโมลาร์
1×SSC = ซาลีน-โซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 1 เท่า
DAP = ไดอะมิโนพิเมลิก
ng/µl = นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
g/ml = กรัมต่อมิลลิลิตร
mm = มิลลิเมตร
µm = ไมโครเมตร
% = ร้อยละ
pH = ค่าความเป็นกรด-ด่าง
DNA = Deoxyribonucleic acid
RNA = Ribonucleic acid
rDNA = ribosomal Deoxyribonucleic acid
rRNA = ribosomal Ribonucleic acid
A = อะดีนีน
G = กวานีน
U = ยูราซิล
C = ไซโทซิน

PC = Phosphatidylcholine
PG = Phosphatidylglycerol
PI = Phosphatidylinositol
PE = Phosphatidylethanolamine
DPG = Diphosphatidylglycerol
GluNu = Glucosamine containing phospholipids
V = variation
TLC = โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง
SDS = Sodium dodecyl sulphate
HCl = กรดไฮโดรคลอริก
KOH = โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
NaCl = โซเดียมคลอไรด์
NaOH = โซเดียมไฮดรอกไซด์
EDTA = Ethylene Diamine Tetra Acetic
$H_2SO_4$ = กรดซัลฟิวริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนแบคทีเรียมากขึ้น เนื่องจากเชื้อแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น การสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ การสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ การสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยังเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จากประโยชน์เหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ เช่น ในทางการแพทย์ เชื้อแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณมากถึง 2 ใน 3 ของสารปฏิชีวนะที่ค้นพบจากธรรมชาติ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้มีความหลากหลายด้านโครงสร้างทางเคมี และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงสามารถนำมาประยุกต์ เพื่อใช้ในการผลิตยารักษาโรค ในทางการเกษตรนำเชื้อแอคติโนแบคทีเรียมาเลี้ยงร่วมกับพืช เพื่อช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศ และยังสามารถช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ทำให้สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของพืช และสัตว์ในธรรมชาติได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินและแหล่งน้ำ ในทางอุตสาหกรรมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์อินเวอเทส เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส และเอนไซม์ไลเปส เป็นต้น ดังนั้นจึงมุ่งเน้นการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลที่สมบูรณ์ในการระบุชนิดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษา และวิจัยทางด้านต่างๆในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่สนใจ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ เพื่อระบุชนิดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ค้นพบเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ
2. สามารถเก็บรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมี mycelium แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากราที่สำคัญของแอคติโนแบคทีเรีย คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต และขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขุรขระคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดอาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆเช่น สีส้ม สีครีม สีเทา เป็นต้น ส่วนการเจริญของเส้นใยสามารถเจริญไปเป็นเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศเรียกว่า aerial mycelium และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า substrate mycelium ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรียมากแอคติโนแบคทีเรียจึงเจริญได้อย่างช้า ๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอคติโนแบคทีเรีย จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถนำมาใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกหมวดหมู่ของแอคติโนแบคทีเรียได้

แอคติโนมัยสีทมีรูปร่างที่หลากหลาย คือมีรูปร่างตั้งแต่ทรงกลมไปจนถึงรูปท่อน หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีรูปร่างเป็นเส้นสายที่แตกแขนงหรือหักเป็นท่อนสมาชิก ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สร้างเส้นใย 2 ชนิด คือเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ยกเว้น *Sporichthya* ที่สร้างเฉพาะเส้นใยอากาศ แอคติโนมัยสีทมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่าโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (sporangia) สามารถแบ่งกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามรูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์
4. กลุ่มที่สร้างสปอร์นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด

เส้นใยอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง และเจริญฝังแน่นลงในเนื้อวุ้น ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนิ่ม และร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอคติโนมัยสีทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบนในระยะเริ่มแรกเส้นใยอากาศมีสีขาว และจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมีตั้งแต่สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีดำ สีเทา สีม่วง และสีแดง เป็นต้น บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหาร และมีสีต่างๆ กัน เช่น สีเหลือง สีส้ม สีเทา สีน้ำตาล สีชมพู เป็นต้น

เส้นใยที่แตกกิ่งก้านสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากเลี้ยงผ่านไป 24ชั่วโมง และจะเห็นเป็นโคโลนีในวันที่ 3-4 ของการเจริญ ในขณะที่เส้นใยอากาศจะใช้เวลา 7-14 วันจึงจะเจริญเต็มที่ และในบางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน แอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มก้อน (pellet) เนื่องจากการงอกของสปอร์ และการพันกันแน่นของเส้นใย

แอคติโนมัยสีทมีค่า generation time ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เจริญได้ในอาหารที่มีค่า aw (water activity) เท่ากับ 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอาจมากถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ในบางสกุลเจริญได้ดีในช่วง พีเอช 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-65 องศาเซลเซียส เช่น ในดินปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก

## 2.2 นิเวศวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

สภาพดินที่พบแอคติโนแบคทีเรียเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันคือ นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้ว ยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากๆ ในโคลน แม่น้ำใต้ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร พบว่าในดินทั่วไปมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นด่าง จะพบแอคติโนแบคทีเรียในจำนวนมากกว่า เช่น ดินที่มีพีเอช 6.5-8.0 จะมีจำนวนสูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินมีพีเอชเป็นด่างทั่วๆ ไปจะพบประมาณร้อยละ10-70 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาพที่เหมาะแก่การเจริญของแอคติโนแบคทีเรียได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อย และจะไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด ชนินทร์ และคณะ (2546) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ห้วยขาแข้ง โดยคัดแยกแอคติโนมัยสีท 160 และ 186 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* El-Tarabily (2006) คัดแยก *Streptomyces* และnon-*Streptomycete* แอคติโนมัยสีทจากดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณรอบพืชแตงกวา ซึ่งไอโซเลตที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์เส้นใยเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

การทนความแห้งแล้ง เนื่องจากความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดี จึงพบแอคติโนแบคทีเรียในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น โดยสภาพดินแห้งจะมีจำนวนมาก

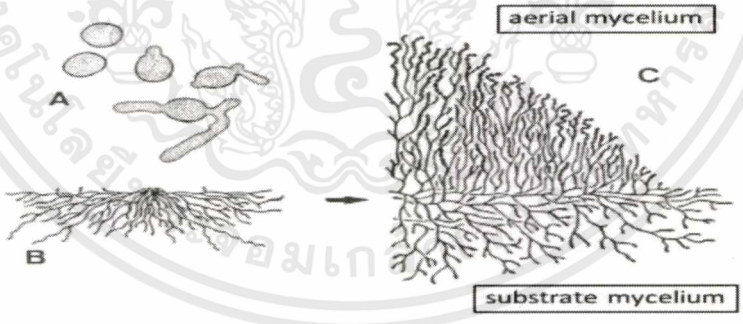
การทนความร้อน โดยทั่วไปสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนได้สูงกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น พบว่าสปอร์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส

ความสามารถในการแข่งขัน จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ในสภาพธรรมชาติ แต่แอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรีย และเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอคติโนแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนแบคทีเรียคือสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่างแห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง เป็นต้น

## 2.3 สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย

### 2.3.1 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง (รูปที่ 2.1) เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม




รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย

B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปในอาหาร (substrate mycelium)

C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

ที่มา : Atlas of *Actinomycetes* (1997)

### 2.3.2 ลักษณะของโคโลนี

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนีใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัด ทำให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียฟูหรือเรียบแบน บางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่นูน เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ นูน ขรุขระหรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี มีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

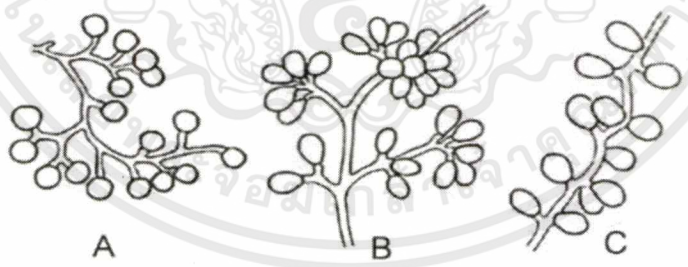
ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีแอคติโนแบคทีเรีย

1) ลักษณะของโคโลนี (configuration) รูปร่างของโคโลนีบนจานอาหารอาจมีรูปร่างกลม (round) รูปร่างไม่แน่นนอน และเจริญลามไปบนจานอาหาร (irregular and spreading) หรือเจริญเป็นเส้นคล้ายรากไม้ (rhizoid) เป็นต้น

2) ขนาด (size) โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็ดหมุด จนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร

3) การยกตัวของโคโลนี (elevation) จากพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหาร อาจแบนราบหรือนูน จึงท าให้โคโลนีที่ยกตัวมีหลายแบบ

4) ขอบของโคโลนีจุลินทรีย์ (margin) มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ โครงสร้างภายในเส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น และเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ในไซโตพลาสซึมประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึม อาจเกิดมีโซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์




รูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว

A: *Micromonospora*

B: *Thermomonospora*

C: *Saccharomonospora*

ที่มา : Atlas of *Actinomycetes* (1997)

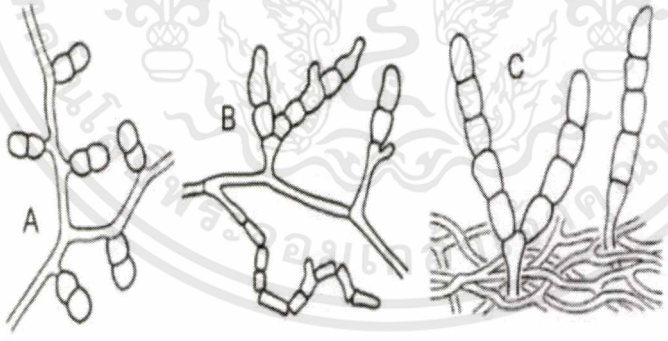
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.3 การสร้างสปอร์**

แอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

1) การสร้างสปอร์เดี่ยว การสร้างสปอร์เดี่ยว เรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกั้น และสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยว คือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora, Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora,Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (รูปที่ 2.2)

2) การสร้างสปอร์เป็นสายในแอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั่นคือ di หรือ bisporous, oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (รูปที่ 2.3) นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออก และสร้างผนังกั้นตรงกลาง




รูปที่ 2.3 ลักษณะสปอร์เป็นสาย

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

B และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

ที่มา: Atlas of *Actinomycetes* (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์ (รูปที่ 2.3) บนสายใยอาหารในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula*ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ *N. brevicatena* และ *S. rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปีชีส์ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสปอร์สายสั้นๆบนสายใยอากาศ จำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ และจนถึง 10 -20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรงเป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อน 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptoverticllium* มีลักษณะเฉพาะคือก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์เป็นเกลียวซ้อนติดกันกับเส้นใย แกนที่มีสายสปอร์จะเกิดการบิดสายสปอร์สั้นอาจจะตรงโค้งงอปลายเป็นขอ การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora, Microcelosporia* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้นหรือสายสั้นๆ บนสายใยอาหาร สายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์กลม *Catellatopora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนโค้งงอ มีสปอร์ 5 – 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหารเป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง

แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญ สปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ (รูปที่ 2.4) สปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีสปอร์มากกว่ามักเรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มเชื้อรา ในกลุ่ม *Deuteromycota* ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ คือ

1) Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ

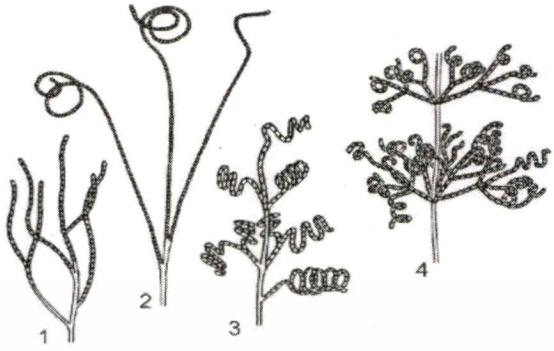
2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1–3 ชั้น

3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น

4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย และแตกแขนงกันแน่น

ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่น และแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศอีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiopsis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง งอหรือซิกแซก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*

1: Rectiflexbiles

2: Retinaculiaperti

3: Spira

4: Verticillati

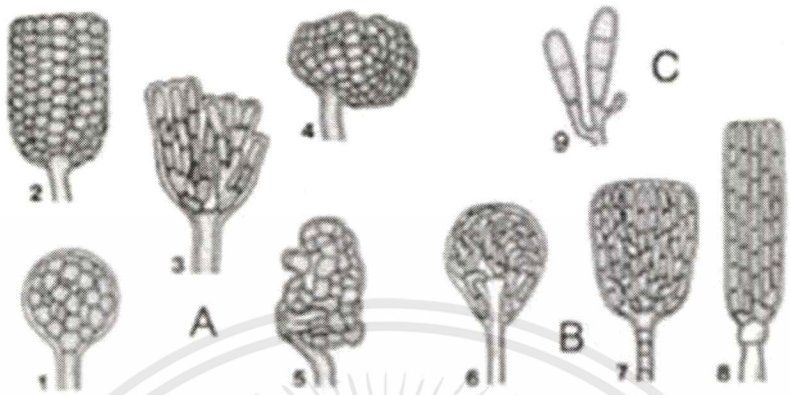
ที่มา : Atlas of *Actinomycetes* (1997)

3) การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

3.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือ เกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5–15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสาย และแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม (รูปที่ 2.5) สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Atinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสายอีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวกวนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ Oliosporous คือมีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

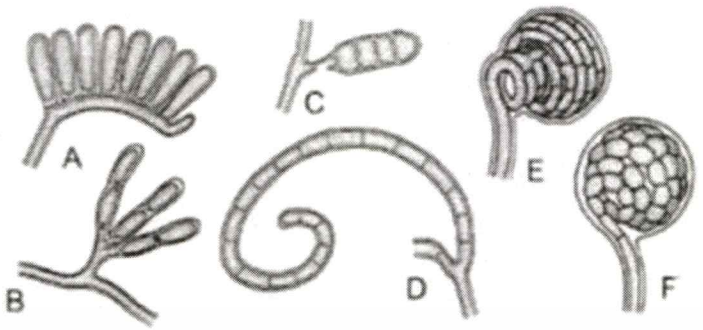



รูปที่ 2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*) 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู
4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง
B: สกุล *Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก
C: สกุล *Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก
ที่มา : Atlas of *Actinomycetes* (1997)

3.2) กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ (รูปที่ 2.6) ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในสปอร์ อับสปอร์เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบบยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมหาศาล ต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกั้นเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ใน ภายในอับสปอร์ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ สกุล *Spirllospora* มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูป แท่งและโค้งงอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 2.6 รูปทรงของอับสปอร์

A: สกุล *Planomospora* : monosporous, รูปกระบอง

B: สกุล *Planobispora* : disporous, ทรงกระบอก

C: สกุล *Planotatraspora* : tetrasporous, ทรงกระบอก

D: สกุล *Planopolyspora* : polysporous, รูปทรงคล้ายท่อ

E: สกุล *Spirllspora* : polysporous, ทรงกลม

F: สกุล *Streptosporangium* : polysporous, ทรงกลม

ที่มา : Atlas of *Actinomycetes* (1997)

## 2.4 การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย

โดยทั่วไปข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย คือ

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียมีความจำเป็นสำหรับการจัดจำแนก ชนิดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียอย่างมาก เช่น ลักษณะการสร้างเส้นใยในการเจริญเติบโตในอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ต่างๆ โดยลักษณะเส้นใย เช่น เส้นใยอากาศ การเกิดกระบวนการการแตกกิ่งก้านของเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหาร ดูลักษณะการสร้างสปอร์ โดยดูลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นว่าเป็นแบบเดี่ยวๆเป็นสายยาวหรือเป็นสายสั้นๆตลอดถึงจำนวนของสปอร์ต่อสายบนก้านชูสปอร์ รวมถึงดูลักษณะรูปรางเส้นใย ดูรูปร่างและขนาดของ สปอร์แรงเจียม รวมถึงดูจำนวนสปอร์แรงจิโอสปอร์ต่อสปอร์แรงเจียม

2.4.2 ลักษณะการจำแนกทางเคมี

ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ Dibasic amino acid ในผนังเซลล์และการวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ที่ถูกย่อย สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรียได้อีกด้วย จากการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของเซลล์ ได้แบ่งผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียออกได้เป็น 4 ชนิด (ตารางที่ 2.1) ผนังเซลล์ I คือมี diaminopimelic acid (DAP) ที่ไอโซเมอร์แบบ *L*- พบในกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Streptomycetes* และในสกุลที่ใกล้เคียงกันซึ่งทำให้สามารถจำแนกกลุ่มดังกล่าวออกจากแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย

| ชนิดผนังเซลล์ | รูปแบบของกรดอะมิโนและน้ำตาล |
|---|---|
| I | *L*-diaminopimelic acid ไกลซีน |
| II | *meso** diaminopimelic acid ไกลซีน |
| III | *meso* diaminopimelic acid ไม่พบไกลซีน |
| IV | *meso* diaminopimelic acid อะราบิโนส กาแลคโตส ไม่พบไกลซีน |

*อาจพบในรูปของ 3-hydroxy diaminopimelic acid

(ที่มา: ยุวดี, 2546)

2.4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหาร

ดูระยะการเจริญเติบโตบนอาหาร ISP ต่างๆ นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย คือ ลักษณะรูปร่างและของสายใยสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่สู่ในอาหาร (diffusible pigment) การสร้างรงควัตถุเมลานิน

2.4.4 ลักษณะทางจีโนไทป์

การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ตามรายละเอียดข้างต้นสามารถใช้ในการจำแนกแอคติโนแบคทีเรียออกได้เป็น 8 กลุ่มใหญ่ดังนี้

1) *Nocardioform Actinomycetes* กลุ่มนี้มีลักษณะแตกต่างกัน ส่วนมากมีการแตกหักของเส้นใยบางกลุ่มมีการสร้างสายใยอากาศอาจมีหรือไม่ Mycolic acid สามารถแบ่ง กลุ่มย่อยได้ดังนี้

1.1) แอคติโนแบคทีเรียที่พบ Mycolic acid

1.2) *Pseudonocardia* และสกุลใกล้เคียง

1.3) *Nocardiosis* และ *Terrabacter*

1.4) *Promicronospora* และสกุลใกล้เคียง

2) *Actinomycetes with multilocuar sporangina* กลุ่มนี้เส้นใยมีการสร้างผนังกั้นแบ่งตามยาวและตามขวางมีการสร้างสปอร์ขนาดใหญ่สปอร์อาจเคลื่อนที่ได้ เช่นสกุล *Dermatophilus* และ *Geodermatophilus* เป็นต้น หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น สกุล *Frankia*

3) *Actinoplanetes* มีการสร้างเส้นใยที่แข็งแรงไม่พบการสร้างสายใยอากาศหรือมีการสร้างน้อยสปอร์เคลื่อนที่ได้เกิดในอับสปอร์ (*Actinoplanes, Ampullariella, Dactylosporngium* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Pilimelia*) หรือสปอร์สร้างเดี่ยวที่ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Micromonospora* หรือสปอร์ต่อกันเป็นสาย ได้แก่ *Catellatospora* ผนังเซลล์ประกอยด้วย *meso*-DAP และไกลซีน ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบ อะราบิโนส และไซโลส

4) *Streptomycetes* และสกุลที่ใกล้เคียงผนังเซลล์ประกอบด้วย *L*-DAP และไกลซีน มีการสร้างสายใยสปอร์ สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ในสกุลอื่น คือ *Kineosporia* และ *Sporichthya* มีการสร้างสายใยอากาศน้อยหรือไม่สร้างและมีการสร้างสปอร์ในลักษณะที่แตกต่างกันไป

5) *Maduromycetes* สร้างสปอร์สายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ มีการสร้างสปอร์ 2 สปอร์พบในสกุล *Microbispora* การสร้างสปอร์สี่สปอร์ พบในสกุล *Microtetraspora* และใน *Actinomadura* มีการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ในบางสกุลมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planbispora, Planomospora* และ*Spirllora* หรือสปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ *Streptosporangium* ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAPในเซลล์ที่ถูกย่อยพบ Madurose

6) *Thermomonospora* และสกุลใกล้เคียงสร้างสปอร์บนสายใยอากาศอาจเป็นสปอร์เดี่ยว ได้แก่ *Thermomonospora* สปอร์ต่อกันเป็นสายพบใน *Atinosynnema* และ *Nocardiopsis* หรือสร้างสปอร์ในโครงสร้างที่คล้ายกับอับสปอร์คือ *Streptoalloteichus* ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP

7) *Thermoactinomycetes* ประกอบด้วยสกุล *Thermoactinomyces* เพียงสกุลเดียว สร้างสปอร์เดี่ยวซึ่งเป็น Endospore มีการสร้างทั้งสายใยอากาศ และสายใยอาหารทุกสปีชีส์เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP

8) สกุลอื่นๆ เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดเข้าในกกลุ่มอื่นได้ ประกอบด้วย*สกุล Kitasatoporia, Glycomyces, Kibdelosporangium* และ *Sacchaothrix* ทุกสกุลมีการสร้างสายสปอร์บนสายใยอากาศ

ชนิดของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่สำคัญ

เชื้อแอคติโนแบคทีเรียมากมายหลายชนิด บางชนิดก็พบได้ง่ายบางชนิดก็พบได้ยาก ซึ่งแต่ละชนิดก็มีความสำคัญแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สำคัญ

| ลำดับย่อย | กลุ่ม | สกุล |
|---|---|---|
| *Micromonosporineae* | *Micromonosporiceae* | *Micromonospora, Actinoplanes, Catellatospora, Couchioplanes, Catenuloplanes, Pilimalia, Dactylosporangium* |
| *Frankinea* | *Frankiaceae*<br>*Spoichthyaceae*<br>*Geodermatophilaceae* | *Frankia*<br>*Spoichothya*<br>*Geodermatophilis, Blastococus* |
| | *Microsphaeraceae*<br>*Acidothermaceae* | *Microsphera*<br>*Acidothermus* |
| *Streptomycineae* | *Streptomycaiace* | *Streptomyces* |
| *Pseudonocardineae* | *Pseudonocardiaceae* | *Pseudonocardia, Actinopolyspora, Actinosynnema, Amycolatopsis, Kibdelosporangium, Kutzneria, Lentzea, Saccharomonospra, Saccharopolyspora, Saccharothrix, Streptoalloteichus, Thermocrispum* |
| *Corynebacterium* | *Nocardiaceae*<br>*Cordoniaceae*<br>*Mycobacteriaceae*<br>*Dietziaceae*<br>*Tsukamurellaceae*<br>*Corynebacteriaceae* | *Nocardia, Rhodococus*<br>*Gordonia*<br>*Mycobacterium*<br>*Dietzia*<br>*Tsukamurella*<br>*Corynebacterium, Turicella* |
| *Micrococcineae* | *Micrococcaceae*<br><br><br><br>*Brevibacteriaceae* | *Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria, Nesterenkonia, Rothia Renibacterium, Stomatococcus*<br>*Brevibacterium* |
| | *Cellulomonadaceae*<br>*Dermabacteraceae* | *Cellulomonas, Oerskovia*<br>*Rathrobacter* |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

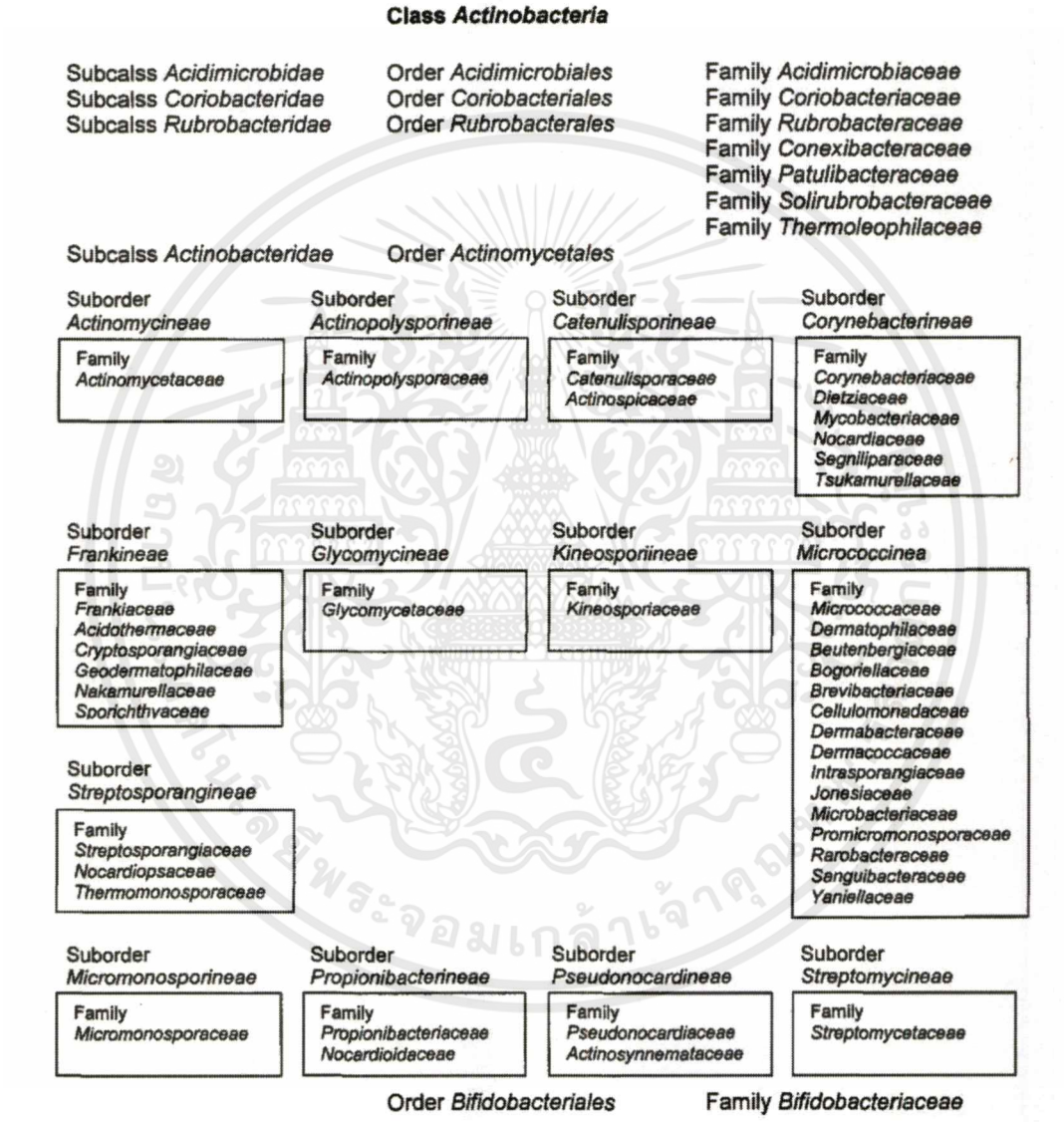
| | | |
|---|---|---|
| | *Dermaphilaceae*<br>*Intrasporangiaceae*<br>*Jonesiaceae*<br>*Microbacteriaceae* | *Dermobacter, Brachybacterium*<br>*Dermatophilus*<br>*Kytococcus, Dermacoccus*<br>*Intrasporangium, Sanguibacter, Terrabacter*<br>*Jonesia* |
| *Actinomycineae* | *Actinomycetaceae* | *Actinomyces, Mobiluncus, Arcanobacterium* |
| *Propionibacterineae* | *Propionibacteraceae* | *Propionibacterium, Luteocooccus, Microlunatus, Propioniferax* |
| *Streptosporangineae* | *Streptpsporangiaceae*<br>*Thermomonosporaceie*<br>*Nocardiopsaceae* | *Streptosporangium, Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora Nocardiopsis* |
| Glycomycineae | Glycornycetaceae | Glycomyces |

ที่มา : วิพัฒน์ และเอกภพ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

Stackebrandt และคณะ (1997) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์และลักษณะทางจีโนไทป์ในการจักอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคติโนแบคทีเรียโดยสามารถจำแนกได้เป็น 5 คลาสย่อย 5 อันดับ 10 อันดับย่อย 30 วงศ์และ 95 สกุล และต่อมาในปี 2009 Zhi และคณะ ได้ทำการปรับระบบของการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทให้เป็นปัจจุบัน




รูปที่ 2.7 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาส Actinobacteria โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอคติโนมัยสีทอยู่ในคลาสย่อยแอคติโนแบคทีริเด (Subclass *Actinobacteridae*) อันดับแอคติโนมัยซิตาเลส (Order *Actinomycetales*) ซึ่งประกอบด้วย 13 อันดับย่อย (Suborder) คือ

1. อันดับย่อยแอคติโนมัยซินีอี (Suborder *Actinomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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 แอคติโนมัยซิตาซีอี (Family *Actinomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Actinomyces, Mobiluncus* และ*Arcanobacterium*

2. อันดับย่อยไมโครคอคคินีอี (Suborder *Micrococcineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) และ1362 (A) ประกอบด้วย 15 วงศ์ คือ

2.1 วงศ์ไมโครคอคคาซีอี (Family *Micrococcaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 8 สกุล ได้แก่ *Micrococcus, Acaricomes, Arthrobacter, Citricoccus, Kocuria, Nesterenkonia, Renibacterium, Rothia* และ*Zhihenglieulla*

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, Xylanimicrobacterium* และ*Xylanimonas*

2.4 วงศ์เดอมาโตฟิลาซีอี (Family *Dermatophilaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุล ได้แก่ *Dermatophilus* และ*Kineosphaera*

2.5 วงศ์เวรวิแบคทีเรียซีอี (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, Arsenicicoccus, Humihabitans, Janibacter, Knoellia, Kribbia, Lapillicoccus, Marihabitans, Ornithinicoccus, Ornithinimicrobium, Oryzihumus, Phycicoccus, Serinicoccus, Terracoccus, Tetrasphaera* และ*Terrabacter*

2.8 วงศ์โจนาเสียซีอี (Family *Jonesiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Jonesia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



2.9 วงศ์ไมโครแบคทีเรียซีอี (Family *Microbacteriaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 27 สกุล ได้แก่ *Agreia, Agrococcus, Agromyces, Clavibacter, Cryobacterium, Curtobacterium, Frigoribacterium, Frondihabitans, Glaciibacter, Gulosibacter, Klugiella, Labedella, Leifsonia, Leucobacter, Microbacterium, Microcella, Mycroterricola, Mycetocola, Okibacterium, Plantibacter, Phycicola, Pseudoclavibacter, Rathayibacter, Rathayibacler, Rathayibacter, Salinibacterium,* และ*Yonghaparkia*

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

2.11 วงศ์โบโกแรลลาซีอี (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 วงศ์ยาแนลลาซีอี (Family *Yaniellaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Yaniella*

3. อันดับย่อยโครีเนแบคทีรินีอี (Suborder *Corynebacterineae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์ คือ

3.1 วงศ์โครีเนแบคทีเรียซีอี (Family *Corynebacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 250 (U), 316:337 (U-G), 418:425 (C-G), 586:755 (U-G), 599:639 (C-G), 662:743 (U-G), 987:1218 (G-C) และ 1059:1198 (U-A) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุล ได้แก่ *Corynebacterium* และ*Turicella*

3.2 วงศ์มัยโคแบคทีเรียซีอี (Family *Microbacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C), 250 (U), 316:377 (C-G), 418:425 (C-G), 586:755 (U-G), 599:639 (U-G), 662:743 (C-G), 987:1218 (G-C), 1000:1040 (A-U) และ1026:1035 (U-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Mycobacterium*

3.3 วงศ์นอคาร์เดียซีอี (Family *Nocardiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 250 (U), 316:377 (C-G), 418:425 (C-G), 580:761 (U-A), 599-639 (C-G), 662:743 (C-G), 987:1218 (G-C) และ 1000:1040 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Millisia* และ*Williumsia*

3.4 วงศ์ทซีคามูเรลลาซีอี (Family *Tsukamurellaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C), 250 (U), 316:377 (C-G),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

141980

418:425 (C-G), 580:761 (C-G), 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*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 241:285 (U-G), 250 (U), 316:377 (C-G), 418:425 (U-A), 599:639 (C-G), 622:743 (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 วงศ์เซกนิลิพาราซีอี (Family *Segniliparaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 128:233 (G-C), 250 (A), 316:337 (C-G), 418:425 (C-G), 586:755 (C-G), 599:639 (C-G), 662:743 (C-G), 987:1218 (G-C), 1000:1040 (A-G) และ 1059:1198 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Segniliparus*

4. อันดับย่อยไมโครโมโนสปอรินีอี (Suborder *Micromonosporineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 127:234 (A-U), 209 (G), 534 (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, Actinocatinispora, Actinoplanes, Asanoa, Catellatospora, Couchioplanes, Catelnuloplanes, Dactylosporangium, Longispora, Pilimelia, Polymorphospora, Planosporangium, Pseudosporangium, Salinispora, Spirilliplanes, Verrucosispora* และ*Virgisporangium*

5. อันดับย่อยโพรไพโอนิแบคทีรินีอี (Suborder *Propionibacterineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

5.1 วงศ์โพรพิโอนิแบคเทอเรียซีอี (Family *Propionibacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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, Microlunatus, Micropruina, Propionicicella, Propionicimonas, Propioniferax, Propionimicrobium* และ*Tessaracoccus*

5.2 วงศ์นอคาร์ดิออยดาเซีย (Family *Nocardioidaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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, Aeromicrobium, Kribbella* และ*Marmoricola*

6. อันดับย่อยซูโดนอคาร์ดินีอี (Suborder *Pseudonocardineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

6.1 วงศ์ซูโดนอคาร์เดียซีอี (Family *Pseudonocardiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 211 (G), 480 (U) และ 142:221 (C-G) เชื้อใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วงศ์นี้มี 12 สกุล ได้แก่ *Actinoalloteichus, Actinomycetospora, Amycolatopsis, Crossiella, Kibdelosporangium, Kutzneria, Goodfellowiella, Prauserella, Pseudonocardia, Saccharomonospora, Saccharopolyspora* และ*Thermocrispum*

6.2 วงศ์แอคติโนซินนีมาตาซีอี (Family *Actinosynnemataceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 211 (A), 480 (G) และ 142:221 (C-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 6 สกุล ได้แก่ *Actinosynnema, Actinokineospora, Lechevalieria, Lentzea, Saccharothrix* และ*Umezawae*

7. อันดับย่อยสเตรปโตมัยซินีอี (Suborder *Streptomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) และ1362 (C) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ สเตรปโตมัยซิตาซีอี (Family *Streptomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*

8. อันดับย่อยสเตรปโตสปอแรงจิเนีอี (Suborder *Streptosporangineae*) ประกอบด้วย 3 วงศ์ คือ

8.1 วงศ์สเตรปโตสปอแรงเจียซีอี (Family *Streptosporangiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 440:497 (C-G), 485 (U), 501:544 (C-G), 502:543 (G-C), 833:853 (U-G) และ1355:1367 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 10 สกุล ได้แก่ *Acrocarpospora, Streptosporangium, Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Nonomuraea, Planotetraspora* และ *Thermopolyspora*

8.2 วงศ์นอคาร์ดิอปซาซีอี (Family *Nocardiopsaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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 วงศ์เทอร์โมโมโนสปอราซีอี (Family *Thermomonosporaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 440:497 (C-G), 501:544 (C-G), 502:543 (G-C), 831:855 (G-G), 843 (U), 844 (A) และ1355:1367 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 4 สกุล ได้แก่ *Thermomonospora, Actinocorallia, Actinomadura* และ*Spirillospora*

9. อันดับย่อยแฟรนคินีอี (Suborder *Frankineae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์ คือ

9.1 วงศ์แฟรนเคียซีอี (Family *Frankiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) และ1308:1329 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Frankia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2 วงศ์จีโอเดอร์มาโตฟิลาซีอี (Family *Geodermatophilaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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), 953:1228 (U-A), 986:1219 (U-A), 1059:1198 (U-A) และ1027:1034 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Geodermatophilus, Blastococcus* และ*Modestobacter*

9.3 วงศ์สปอริชยาซีอี (Family *Sporichthyaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 184:193 (A-G), 195 (C), 196 (A), 416:427 (G-C), 600:638 (U-G), 601:637 (G-U), 602:636 (C-G), 612:628 (U-A), 841 (U), 952:1229 (U-A), 986:1219 (A-U), 1042 (A) และ1059:1198 (U-A) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Sporichthya*

9.4 วงศ์อซิโดเทอร์มาซีอี (Family *Acidothermaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) และ1308:1329 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Acidothermus*

9.5 วงศ์คริปโตสปอแรงเจียซีอี (Family *Cryptosporangiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 195 (U), 196 (C), 601:637 (A-U), 602:636 (C-G), 952:1229 (C-G), 986:1219 (A-U), 1042 (U), 1059:1198 (U-A), 1251 (G) และ 1003:1037 (A-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Cryptosporangium*

9.6 วงศ์นากามูเรลาซีอี (Family *Nakamurellaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 184:193 (A-C), 195 (C), 196 (A), 589:650 (U-A), 601:637 (A-U), 602:636 (A-U), 670:736 (U-A), 841 (C), 952:1229 (C-G), 955:1225 (A-U), 986:1219 (A-U), 1059:1168 (U-A), 1120:1153 (U-A) และ1027:1034 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Nakamurella, Humicoccus* และ*Saxeibacter*

10. อันดับย่อยไกลโคมัยซินีอี (Suborder *Glycomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 657:749 (G-U), 672:734 (C-G), 618:709 (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) และ1117:1183 (A-U) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือวงศ์ไกลโคมัยซิตาซีอี (Family *Glycomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Glycomyces*

11. อันดับย่อยแอคติโนโพลีสปอรินีอี (Suborder *Actinopolysporineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) และ1309:1328 (G-U) ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 วงศ์ คือ วงศ์แอคติโนโพลีสปอราซีอี (Family *Actinopolysporaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Actinopolyspora*

12. อันดับย่อยคาเทนูลิสปอรินีอี (Suborder *Catenulisporineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ

12.1 วงศ์คาเทนูลิสปอราซีอี (Family *Catenulisporaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 262 (A), 344 (G), 576 (G), 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) และ999:1041 (U-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Catenulispora*

12.2 วงศ์แอคติโนสปิคาซีอี (Family *Actinospicaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 262 (G), 344 (G), 576 (G), 747 (U), 129:232 (A-G), 580:761 (C-G), 586:755 (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) และ999:1041 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Actinospica*

13. อันดับย่อยไคนิโอสปอริอินีอี (Suborder *Kineosporiineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signature nucleotide ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) และ1165:1171 (G-A) ประกอบด้วย 1 วงศ์ คือ วงศ์ไคนิโอสปอเรียซีอี (Family *Kineosporiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุล ได้แก่ *Kineosporia, Kineococcus* และ*Quadrisphaera*

## 2.6 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ทั่วไปในดิน ในดินนอกจากจะมีเชื้อแอคติโนมัยสีทแล้ว ยังมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกหลายชนิดอาศัยอยู่ เช่น แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะทำให้เกิดความสมดุลของระบบนิเวศ ด้วยเหตุที่ในดินมีสิ่งมีชีวิตอยู่หลายชนิด ดังนั้นการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจึงจำเป็นต้องทำการกำจัดเชื้อชนิดอื่นก่อนโดยอาศัยลักษณะพิเศษของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตทั่วไป คือ สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อความร้อน และทนต่อสารเคมีได้ ในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดิน เชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* พบได้ในจำนวนมากที่สุด เนื่องจากเชื้อสกุลนี้เจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็ว ทำให้เกิดการแย่ง และบดบังของการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลอื่น ดังนั้นจำเป็นต้องมีการนำเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น เทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการในตัวอย่างดิน (enrichment) หรือเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) เพื่อลดจำนวนหรือขจัดเชื้อในสกุล *Streptomyces* และเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมีเทคนิคการคัดแยกหลายวิธี ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.6.1 การใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage)**

เฟจ (phage) ถูกใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการ ทำให้สามารถแยกเชื้อในกลุ่มเป้าหมายได้ โดยเฟจมีความไวต่อแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ขัดขวางการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากการใช้แบคเทอริโอเฟจในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก อาจใช้เฟจที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์ เรียกว่า โพลีวาเลนท์เฟจ (polyvalent phage) เพื่อลดจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการบนจานอาหาร ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้มีการตรวจพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากและเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ได้ ตัวอย่างเช่น การใช้แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ *Bacillus* (*Bacillus* phage) และการใช้แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ *Streptomyces* (*Streptomyces* phage) เป็นต้น จากการเจือจางตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากด้วยสารละลายโพลีวาเลนท์เฟจที่ความเข้มข้นต่างๆแทนการใช้น้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ แล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้เพาะลงบนอาหารที่ใช้แยกเชื้อพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อที่ไม่ต้องการได้ โดยเมื่อใช้สารละลายโพลีวาเลนท์ที่มีความเข้มข้น $10^{10\text{-}12}$ pfuต่อมิลลิลิตรจะลดเชื้อที่ไม่ต้องการได้ดีที่สุด

**2.6.2 การใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment techniques)**

เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างวิธีต่างๆร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และมีการเติมสารปฏิชีวนะลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การเพิ่มโอกาสเพื่อทำให้สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมักทำโดยใช้กลยุทธ์ ดังนี้

2.6.2.1 การขจัดเชื้อสกุล *Streptomyces* และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

เป็นการขจัดหรือลดปริมาณจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ รวมทั้งเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งจัดเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบได้ทั่วไปและมีอยู่จำนวนมากในดิน ซึ่งจะใช้คุณสมบัติที่แตกต่างกันของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสกุล การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) มีหลายวิธี ได้แก่

1.การใช้ความร้อนแห้ง (dry heating)

การให้ความร้อนแห้งแก่ตัวอย่างดินแห้งที่อุณหภูมิ 100 หรือ 120 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยและเชื้อในสกุล *Streptomyces* ได้ ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทหายากบางสกุล เช่น *Microbispora* และ *Streptosporangium* ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยผลลัพธ์ของวิธีนี้สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้หลายสกุล เช่น *Actinomadura Kutzneria, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Sacharomonospora, Streptosporangium* และ*Thermobifida*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ (chemical germicides)

ความทนทานต่อสารเคมีของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากชนิดต่างๆ สามารถเป็นกลยุทธ์ในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้อย่างจำเพาะ (specific rare actinomycetes) ความทนทานของสปอร์ต่อสารเคมีฆ่าเชื้อ เช่น สารละลายฟีนอล (phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 สารละลายคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต (chlorhexidine gluconate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 และสารละลายเบนซีโทเนียมคลอไรด์ (benzetonium chlorride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 สามารถใช้ในวิธีการแยกแอคติโนมัยสีทหายากได้ ตารางที่ 2.2

3.การใช้การปั่นเหวี่ยงด้วยแรงที่แตกต่าง (differential centrifugation)

เชื้อแอคติโนมัยสีทบางกลุ่มสร้างซูโอสปอร์(zoospore)ที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา เช่น *Actinoplanes Dactylosporangium Actinokineospora Actinosynnema* และ*Kineosporia* เป็นต้น การปั่นเหวี่ยงสามารถนำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่ออกจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุลที่ไม่เคลื่อนที่ได้

2.6.2.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก (enrichment of rare actinomycete populations)

1. การเพิ่มจำนวนก่อนการบ่ม (prior incubation of the substrate)

เป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากในตัวอย่างที่ต้องการแยก ก่อนเพาะลงบนจานอาหาร ซึ่งอาจทำโดยการบ่มตัวอย่างดินโดยตรงลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเฉพาะ เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น *Microbispora* และ *Microtetraspora* การเตรียมตัวอย่างดินด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) ในสภาวะควบคุมสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อ *Actinokineospora* spp. ได้ดี หรือการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซอยเอ็กแทรกท์ (phosphate buffer-soil extract) สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างซูโอสปอร์ เช่น *Actinokineospora Actinosynnema Catenuloplanes Cryptosporangium Dactylosporangium Geodermatogillus Kineosporia* และ*Sporichthya* ได้เช่นกัน

2. การใช้สารเคมีเป็นตัวดึงดูด (chemotaxis)

เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยใช้หลักการเคลื่อนที่เข้าหาหรือหนีห่างจากสารเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักใช้อุปกรณ์พิเศษที่เรียกว่า ลูไซท์ (Lucite plate) ซึ่งมีความหนา 9 มิลลิเมตร และมีหลุม (well) รูปทรงกระบอก 2 หลุม หลุมหนึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 มิลลิเมตร ส่วนอีกหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 32 มิลลิเมตร หลุมทั้งสองจะเชื่อมกันด้วยช่อง (channel) ขนาดกว้าง 2 มิลลิเมตร และลึก 3 มิลลิเมตร นำดินตัวอย่างที่ผึ่งแห้งแล้วน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมบัฟเฟอร์ที่เป็นตัวดึงดูด (chemotaxis buffer) ที่มีส่วนผสมของสารที่มีผลดึงดูดให้เชื้อแอคติโนมัยสีทเคลื่อนที่เข้าหา (attractants) เช่น โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) คอลลิดีน (collidine) และวานิลลิน (vanillin) ลงในหลอดแก้วแคปิลลารี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(glass capillary tube) ขนาด 1 ไมโครลิตร แล้ววางลงในช่องเพื่อเก็บชูโอสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่เข้าหา จากนั้นนำสปอร์ที่อยู่ในหลอดแก้วแคปิลลารีมาเจือจางแล้วเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2.3 ค่าร้อยละของสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อที่อยู่รอดเมื่อแยกด้วยเทคนิคการใช้สารเคมี (Hayakawa. 2003)

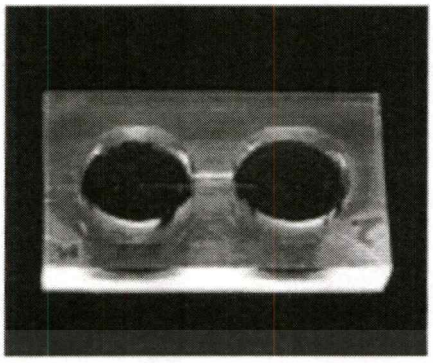
| Genus | structure | survival %[a] | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1.5% phenol | 0.01% BC | 0.01% CG |
| Actinomycetes | | | | |
| *Micromonosporaceae* | | | | |
| *Actinoplanes* (2)[b] | Sporangiospores | 0 | 0 | 0 |
| *Dactylosporangium* (2) | Aleuriospores | 0 | 51 | 0 |
| | Sporangiospores | 0 | 0 | 0 |
| *Micromonospora* (5) | Aleuriospores | 76 | 1 | 5 |
| *Nocardiaceae* | | | | |
| *Nocardia* (1) | Athrospores | 0 | 0 | 2 |
| *Pseudonocardiaceae* | | | | |
| *Saccharomonospora* (1) | Aleuriospores | 0 | 0 | 0 |
| *Streptomycetaceae* | | | | |
| *Streptomyces* (8) | Athrospores | 1 | 0 | 2 |
| *Streptosporangiaceae* | | | | |
| *Microbispora* (2) | Athrospores | 53 | 70 | 63 |
| *Microtetraspora* (3) | Athrospores | 1 | 70 | 81 |
| *Nonomuraea* (2) | Athrospores | 1 | 4 | 17 |
| *Streptosporangium* (5) | Sporangiospores | 12 | 26 | 22 |
| *Thermomonosporaceae* | | | | |
| *Actinomadura* (3) | Athrospores | 57 | 0 | 14 |
| Other bacteria | | | | |
| Gram-positive rods | | | | |
| *Bacillus* (1) | Endospores | 91 | 63 | 82 |
| | Vegetative cells | 0 | 0 | 0 |
| Gram-negative aerobes | | | | |
| *Pseudomonas* (2) | Vegetative cells | 0 | 0 | 0 |

a) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

b) BC คือ benzethonium chloride CG คือ chlorhexidine gluconat

[b] จำนวนสปีชีส์ที่ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ลูไซท์ เพลท

3. การใช้เหยื่อล่อ (baiting)

เทคนิคการใช้ละอองเกสรดอกไม้เป็นเหยื่อล่อ (pollen-baiting technique) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากวิธีการแยกราน้ำ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์หลายท่านใช้สำหรับแยกเชื้อ *Actinoplanes* spp. แม้ว่าเหยื่อต่างๆ เช่น ละอองเกสรดอกไม้ (pollen) หนังงู (snake skin) ใบหญ้า (grass leaves) และขนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถใช้ดึงดูดซูโอสปอร์ของ *Actinoplanes* ได้ แต่เหยื่อที่นิยมมากที่สุด คือ ละอองเกสร (pollen grains) ของสน (Pinus) เนื่องจากอยู่ในถุงหุ้มและสามารถลอยน้ำได้ตลอด ทำให้ซูโอสปอร์ของเชื้อว่ายเข้ามายึดติดและมีอากาศเพียงพอต่อการเจริญ

2.6.2.3 การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดเลือก (selective nutrient media)

โดยทั่วไปแล้วเชื้อแอคติโนมัยสีทมีข้อเสียเปรียบจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่อาศัยอยู่ในแหล่งธรรมชาติเดียวกันเมื่อเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเจริญได้ช้ากว่า ดังนั้นอาหารที่ใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจึงต้องออกแบบให้มีผลขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์คู่แข่งและไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท อาหารที่ใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากต้องเป็นอาหารที่ไม่อุดมสมบูรณ์ เนื่องจากอาหารที่อุดมสมบูรณ์จะทำให้ *Streptomyces* และแบคทีเรียอื่นเจริญได้ดีมาก เป็นผลให้พบจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทหานากน้อยลง เชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น *Microbispora* และ *Streptosporangium* ต้องการสารอาหารในปริมาณน้อยสำหรับการสร้างสปอร์ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท เช่น อาร์จินีน วิตามิน เอการ์ (arginine vitamin agar) และฮิวมิก เอซิด- วิตามิน เอการ์ (humic acid-vitamin agar) ที่มีการเติมสารละลายวิตามินลงไปด้วย เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายชนิดต้องการวิตามิน-บี เพื่อใช้ในการเจริญ อาหารฮิวมิก เอซิด- วิตามิน เอการ์ (humic acid-vitamin agar) ประกอบด้วยกรดฮิวมิก (humic acid) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แบคทีเรียในดินทั่วไปไม่สามารถใช้ได้ บนอาหารนี้พบเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายชนิดเจริญได้ เช่น *Microbispora* *Micromonospora* และ *Streptosporangium* ในขณะที่จำกัดการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่สร้างเส้นใย นอกจากนี้เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยสีทหายากที่เจริญบนอาหารชนิดนี้จะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะสมบูรณ์ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการแยกเชื้อเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยาได้

2.6.2.4 การใช้สารปฏิชีวนะ

การเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารที่ใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีท สามารถเพิ่มโอกาสที่ในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ สารปฏิชีวนะที่ใช้มักเป็นสารลดการปนเปื้อนของเชื้อรา เช่น ไซโคลเฮกวิไมด์ (cycloheximide) นิสเตติน (nystatin) และไพมาริซิน (pimaricin) เป็นต้น สำหรับการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย มักนิยมใช้สารปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกัน เช่น การใช้เพนนิซิลิน-จี (penicillin G) ร่วมกับโพลีมิกซิน-บี (polymyxin B) ในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดิน และการใช้ไตรเมโทพริม (trimethoprim) ร่วมกับกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) เป็นต้น นอกจากนี้สารปฏิชีวนะยังสามารถใช้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากเฉพาะกลุ่มได้ เช่น การใช้ทูนิคามัยซิน (tunicamycin) สำหรับแยกเชื้อสกุล *Micromonospora* การใช้ลิวโคมัยซิน (leucomycin) สำหรับแยกเชื้อสกุล *Streptosporangium* เป็นต้น การใช้สารปฏิชีวนะชนิดที่แตกต่างร่วมกันสามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เฉพาะในระดับสกุลหรือระดับสปีชีส์ได้ เช่น การใช้กานามัยซิน (kanamycin) นอฟลอกซาซิน (norfloxacin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ *Microtetraspora* spp. การใช้ฟราดิโอมัยซิน (fradiomycin) กานามัยซิน (kanamycin) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) และไตรเมโทพริม (trimethoprim) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ *Actinokineospora* spp. และการใช้กานามัยซิน (kanamycin) โจซามัยซิน (josamycin) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) และไลโซไซม์ (lysozyme) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ *Actinomaduraviridis*

**2.6.3 การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave) และการใช้กระแสไฟฟ้าเป็นระยะ (electric pulse)**

2.6.3.1 การใช้รังสีความถี่ยิ่งยวด (superhigh frequency radiation, SHF)

รังสีความถี่ยิ่งยวดหรือไมโครเวฟ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อได้ทั้งแบบสเตอริไลเซชั่น (sterilization) และพาสเจอไรเซชั่น (pasteurization) ผลของไมโครเวฟที่มีต่อแบคทีเรียชนิดไม่ทนความร้อนนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการฉายรังสีและความเข้มข้นของจุลินทรีย์เริ่มต้น จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์สามารถทนต่อไมโครเวฟได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์ ดังนั้นจึงสามารถนำไมโครเวฟมาใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ โดยแผ่รังสีไมโครเวฟลงในสารละลายดินตัวอย่าง ซึ่งใช้ความถี่และกำลังไฟฟ้าในอัตราต่างๆ แล้วค่อยนำสารละลายดินตัวอย่างนั้นมาเพาะลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมหรือไม่เติมสารปฏิชีวนะ

2.6.3.2 การให้กระแสไฟฟ้าเป็นระยะ (electric pulses)

การให้กระแสไฟฟ้าสลับเป็นช่วงๆสามารถใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีผลทำให้เกิดอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) ต่อตัวเซลล์แบคทีเรีย หลักการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้เช่นเดียวกัน โดยการนำตัวอย่างสารละลายดินมาผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแสไฟฟ้าเป็นระยะๆ จากการทดลองพบว่าสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมีความทนทานต่อกระแสไฟฟ้าได้ดีกว่าสปอร์ของเชื้อสกุล *Streptomyces* ดังนั้นวิธีนี้จึงทำให้สามารถเพิ่มอัตราการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้มากขึ้น และสามารถลดอัตราการพบเชื้อในสกุล *Streptomyces* ให้น้อยลงได้

2.6.3.3 การใช้รังสีความถี่สูงสุด (extream high frequency radiation, EHF)

รังสีความถี่สูงสุดสามารถใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำรังสีความถี่สูงสุดมาใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนต่อรังสีชนิดนี้ได้ ซึ่งได้มีการศึกษาการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก โดยการใช้รังสีความถี่สูงสุดแผ่ลงบนสารละลายดินตัวอย่างที่ความยาวคลื่นต่างๆ พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆได้ดี ทำให้เพิ่มโอกาสในการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้มากขึ้น

2.6.3.4 ตัวอย่างการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) หลายวิธีร่วมกันสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากเฉพาะสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตัวอย่างวิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน

| Pretreatment | Media[a)] | Genera selected | References |
|---|---|---|---|
| **Physical:** Dry heat at 120°C for 1 h | AV agar, MC agar, MGA-SE agar or salts-starch agar with cycloheximide, nystatin, polymixin B and penicillin | *Actinomadura, Kutzneria, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Saccharomonospora, Streptosporangium* and *Thermobifida* | Nonomura และ Ohara. 1969 a, b, 1971 a, b, c, d, 1974 |
| **Physical and enrichment:** Dry heat at 120°C (or 100°C) for 1 h and cultivation on agar | AV agar, GAC agar, MGA-SE agar or soil-extract agar with cycloheximide, nystatin, polymixin B and penicillin | *Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora* and *Streptosporangium* | Nonomura และOhara. 1960 a,b, 1969 a, 1971 a, b |
| **Chemical:** Phenol 1.5% | HV agar with nalidixic acid and tunicamycin | *Micromonospora* | Hayakawa และคณะ. 1991a |
| Chloramine-T | HV agar | *Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea* and *Streptosporangium* | Hayakawa และคณะ. 1997 |
| **Physical and chemical:** Dry heat at 110°C for 1 h and phenol 1.0% | HV agar with kanamycin, josamycin, lysozyme and nalidixic acid | *Actinomadura viridis* | Hayakawa และคณะ. 1995a |
| Dry heat at 120°C for 1 h and phenol 1.5%-CG 0.01% | HV agar with nalidixic acid | *Microbispora* | Hayakawa และคณะ. 1991a |
| Dry heat at 120°C for 1 h and BC 0.01% (or 0.03%) | HV agar with nalidixic acid and leucomycin (or tunicamycin) | *Streptosporangium* or *Dactylosporangium* | Hayakawa และคณะ. 1991b |
| Dry heat at 110°C for 1 h and BC 0.05% | LSV-SE agar with kanamycin, nalidixic acid and norfloxacin | *Microtetraspora* | Hayakawa และคณะ. 1996 |
| **Enrichment:** Chemotaxis (γ-collidine, vanillin) | HV agar with nalidixic acid | *Actinoplanes, Catenuloplanes, Dactylosporangium* and *Virgosporangium* | Hayakawa และคณะ. 1991c, 1995b |
| **Enrichment and physical:** Pollen-baiting and drying | HV agar with nalidixic acid | *Actinoplanes* | Hayakawa และคณะ. 1991d |
| Rehydration (30°C, 90 min) and centrifugation (1,500×g, 20 min) | HV agar with nalidixic acid and trimethoprim | *Actinoplanes, Actinokineospora, Actinosynnema, Catenuloplanes, Cryptosporangium, Dactylosporangium, Geodermatophilus, Kineosporia* and *Sporichthya* | Hayakawa และคณะ. 2000 |
| $CaCo_3$, rehydration and centrifugation | HV agar with fradiomycin, kanamycin, nalidixic acid and trimethoprim | *Actinokineospora* | Otogura และคณะ. 2001 |

[a)] ทั้ง HV agar และ LSV-SE agar มีส่วนผสมของสารยับยั้งเชื้อราไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ของเชื้อ ดังนี้

### 2.7.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristic)

เป็นลักษณะต่างๆที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ ชีวเคมี และสรีรวิทยาของเชื้อ ลักษณะทางฟีโนไทป์นี้เป็นผลมามาจากการแสดงออกของยีนซึ่งมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียนั้นมีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียทั่วไป ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ศึกษา ได้แก่

2.7.1.1 ลักษณะทางสัญฐานวิทยา

มักทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทนั้น สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้ เส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยสีททีี 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยอากาศ ซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างชูขึ้นไปบนอากาศ และเส้นใยอาหาร ซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างแทงลงบนผิวอาหาร มีหน้าที่ในการดูดซึมอาหารมาเลี้ยงส่วนต่างๆของเซลล์เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มักสร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด แต่มีบางชนิดไม่สร้างเส้นใยอากาศ เช่น เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) เป็นต้น

สปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ใหญ่ๆ คือ สปอร์เปลือย (naked spore) เช่น โคนิเดีย (conidia) และสปอร์ท่อยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) เช่น สปอร์แรงจิโอสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อสามารถใช้จักจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทได้เช่นกัน ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยสีท สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบแรก endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic *actinomycetes* เช่น *Thermoactinomyces* และ*Actinobifida* และแบบที่ 2 คือ exogenous formation แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ exogenous โดยเฉพาะ *Streptomyces* spp. Vobis (1997) ได้อธิบายไว้ในหนังสือ Atlas of *Actinomycetes* เกี่ยวกับลักษณะของสปอร์ไว้ดังนี้

1. สปอร์แบบเดี่ยว (Single spore)

กลุ่มที่ผลิตสปอร์เดี่ยวเรียกว่า “monosporous” เช่น ลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) มีก้านชูสปอร์เกิดบริเวณเส้นใยอาหาร สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น การเกิดสปอร์เริ่มจากการโป่งพองบริเวณปลายของเส้นใยลงมาจนถึงผนังกั้นจนมีการฟอร์มตัวเป็นผนังสปอร์ เชื้อสกุลเทอร์โมโมโนสปอรา (*thermomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ บริเวณปลายเส้นใยอาจมีหรือไม่มีการแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์เชื้อสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แซคคาโรโมโนสปอรา (*Saccharomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวมีการพัฒนาบนเส้นใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกกิ่งก้าน ลักษณะของสปอร์เป็นวงรีอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น

2. สปอร์มีลักษณะเรียงตัวเป็นเส้นสาย (spores formed in chains)

สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสาย เกิดจากการแบ่งแยกตามขวางของผนัง การแบ่งผนังส่วนนี้ทำให้มีการเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ ลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้จำแนกลักษณะรูปร่างตามความยาวหรือจำนวนของสปอร์ที่แบ่งได้ เช่น disporous หรือ bisporous หมายถึงสปอร์แบบคู่ oligosporous หมายถึงสปอร์จำนวนเล็กน้อย และpolysporous หมายถึงสปอร์จำนวนมากกว่า 2 ขึ้นไป

สปอร์แบบคู่ (disporous) ประกอบด้วยสปอร์ที่อยู่เป็นคู่ตามยาว ได้แก่ เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ขนาด 2 ไมโครเมตร และมีชั้นที่หนาเป็น 3 ถึง 4 เท่า ของเส้นใยโคโลนี ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นมาก การเกิดของสปอร์ในช่วงแรกเกิดจากการแยกตัวออกตามความยาวจากเส้นใยอากาศ ทำให้เกิดกิ่งก้านสั้นๆ ทางด้านข้างทำให้เกิดการโป่งพอง และสร้างผนังกั้นตามแนวขวาง

แอคติโนมัยสีทที่มีสปอร์จำนวนเล็กน้อย (oligosporous) มีการพัฒนาของสปอร์บนสายสั้นๆ ในแต่ละสายจะมีสปอร์อยู่ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ หรือน้อยที่สุด คือมี 3 ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์และสปอร์อาจแตกกิ่งก้านได้ และเส้นใยอาจมีการหักเป็นท่อนๆ เชื้อสกุลนอคาร์เดีย (*Nocardia*) มีสปอร์ 2 ถึง 7 สปอร์บนก้านชูที่มีขนาดสั้น เชื้อสกุลแอคติโนมอดูรา (*Actinomadura*) และไมโครเตตระสปอรา (*Microtetraspora*) เส้นสายของสปอร์มีขนาดสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศ โดยปกติแอคติโนมอดูรา (*Actinomadura*) มีจำนวนสปอร์มาก 10 ถึง 20 สปอร์บนสายเดียวกัน เส้นใยอาจมีลักษณะตรง โค้งงอ หรือเป็นเกลียวได้ เช่น เส้นสายสปอร์ของเชื้อ *Actinomadura pusilla* มีลักษณะค่อนข้างหนา และเป็นเกลียว เชื้อในกลุ่มนี้มีสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสปอแรงเจียม ของเชื้อสกุลสเตรปโตสปอแรงเจียม (*Streptosporangium*) เรียกว่าซูโดสปอแรงเจีย (*Pseudosporangia*) ลักษณะของสปอร์สายสั้นสามารถสังเกตได้จากเชื้อ *Sporichthya polymorpha* เส้นใยอากาศจะเกิดการแบ่งตัวจากรูปท่อนเป็นสปอร์ที่มีลักษณะกลม

กลุ่มของแอคติโนมัยสีทที่มีสปอร์จำนวนมาก (polysporous) ได้แก่ เชื้อในสกุลสเตรปโตมัยสีท (*Streptomyces*) ซึ่งมีการฟอร์มรูปเป็นเส้นสายที่ยาว และมีมากกว่า 50 สปอร์ ลักษณะรูปร่างของสปอร์ในแต่ละสปีชีส์ของสเตรปโตมัยสีทจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปหลายรูปแบบ

3. อัปสปอร์ที่อยู่ภายในถุงบรรจุสปอร์หรือสปอแรงเจีย
(spores formed within sporangia)

สปอร์ถูกหุ้มด้วยสปอแรงเจีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้ม สปอร์มีการพัฒนา และห่อหุ้มจนกระทั่งสปอร์แก่ จึงมีการปล่อยสปอร์ออกมาจากถุงหุ้ม สปอแรงเจียมีรูปทรงต่างๆได้หลายอย่าง เช่น รุปทรงกระบอก รูปทรงคล้ายหลอดหรือท่อ รูปทรงคล้ายขวด รูปร่างคล้ายร่ม หรือรูปทรงกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์มรขนาด 2 ถึง 50 ไมโครเมตร แต่โดยส่วนใหญ่จะมีขนาด 10 ไมโครเมตร

4. โครงสร้างอื่นๆ

แอคติโนมัยสีทบางชนิดมีลักษณะรูปร่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก บางชนิดอาจมีผนังที่หนา หรือมีรูปร่างเป็นทรงกลม บางชนิดสร้างสปอร์บริเวณแกนเส้นใย

2.7.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

1. คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน

เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งในการแยกเชื้อ เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบ คือ

ก. โคแอกกูเลชัน (coagulation) เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้จะปรากฏลักษณะให้เห็น คือ อาหารมีการรวมกลุ่ม หรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

ข. เปปโตไนเซชัน (peptonization) หากมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้น ลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

2. คุณสมบัติในการย่อยเจลาติน (gelatin)

ความสามารถในการย่อย หรือทำให้เจลาตินเหลว มีประโยชน์ในการดูความแตกต่างของสปีชีส์ และชนิดของแบคทีเรีย เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียย่อยเจลาตินโดยใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เมื่อถูกย่อยเจลาตินจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจล ซึ่งจะเป็นของเหลวถึงแม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการทดสอบ

3.คุณสมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

การสลายตัวของไนเตรต เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต ($KNO_3$) สามารถทดสอบได้โดยหยดกรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟาแนปทิลลามีน ($\alpha$-naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิคและไนเตรต จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) จะรวมตัวกับแนปทิลลานีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye)

5. คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (strarch hydrolysis)

เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อ ซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซคคไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน เมื่อต้มแป้งอะไมโลสจะละลายแต่อะไมโลเพคตินจะไม่ละลาย ทั้งอะไมโลส และอะไมโลเพคติน มีองค์ประกอบของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ในอะไมโลส น้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-$\alpha$-glucosidic ส่วนอะไมโลเพคติน มีทั้งพันธะ 1,4-$\alpha$-glucosidic และ1,6-$\alpha$-glucosidic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรียใช้สารละลายไอโอดีนหยดลงบนผิวอาหาร และถ้าเกิดสีแดงถึงสีม่วงบนผิวอาหารแสดงว่าแป้งไม่ถูกย่อย แต่ถ้าไม่ปรากฏสีบนผิวอาหารแสดงว่าบริเวณนั้นมีการย่อยแป้ง

5.คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เป็นด่าง แต่มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ดังนั้นในการทดสอบคุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง จึงเป็นการจักจำแนก และจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทเบื้องต้น

6.ความสามารถในการทนเกลือ

ในการทดสอบความสามารถในการทนเกลือของเชื้อแอคติโนมัยสีท สามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเจริญในสภาวะที่มีระดับเกลือต่างๆ รวมทั้งสามารถบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆได้ด้วย

7.ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง

ถ้าดูจากอุณหภูมิสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 พวก คือ พวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria ถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง เรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ เรียกว่า psycrophilic bacteria ดังนั้น ในการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันนี้ จึงสามารถช่วยในการจัดจำแนก และแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยสีทได้เช่นกัน

**2.7.2 ลักษณะทางเคโมไทป์**

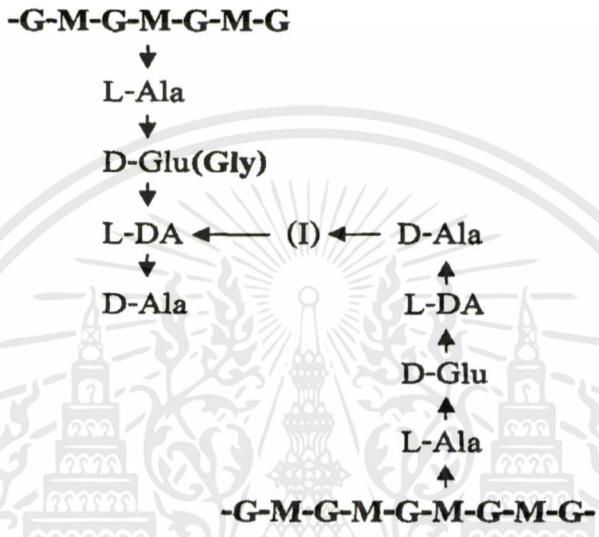
เป็นการศึกษาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างต่างๆของเซลล์ ได้แก่

2.7.2.1 กรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid, DAP )

แบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือเรียกว่า มิวรีอิน (murein) เปปทิโดไกลแคน (รูปที่ 2.9) เป็นโครงสร้างที่ประกอยด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine)เรียงสลับกับกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิก (N-acetylmuramic acid) โดยที่กรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิกจะมีกรดอะมิโนยื่นออกมา และจะไปเชื่อมกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิกของอีกโมเลกุลหนึ่งด้วยพันธะเปปไทด์ จำนวน และชนิดของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งชนิดของกรดอะมิโนที่พบในเปปทิโดไกลแคนนี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการจัดระบบของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งรวมถึงเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วย โดยกรด 2,6 –ไดอะมิโนพิเมลิก (2,6-diaminopimelic; DAP) เป็นกรดอะมิโนพิเมลิกที่สามารถพบได้ในเปปทิโดไกลแคนมีไอโซเมอร์ 2 แบบ คือ แบบ *LL* และแบบ *meso* (*DL*, *DD*) ถ้าในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีกรดไดอะมิโน พิเมลิกประกอบอยู่ จะมีไอโซเมอร์ได้ 1 ชนิดเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย การตรวจสอบกรดไดอะมิโนพิเมลิก และไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกนั้นเป็นขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบนั้นโดยปกติแล้วจะพบไอโซเมอร์ของกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* ในเปปทิโดไกลแคนได้ทั่วไปในปริมาณน้อย ซึ่งการพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* ในแบคทีเรียแกรมลบนี้ ไม่มีความสำคัญในการใช้จัดระบบของเชื้อ ไอโซเมอร์ของไดอะมิโนพิเมลิกสามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกจะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography)




รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน

G คือ N-acetylglucosamine ; M คือ N-acetyl(gltcolyl)muramic acid ; Ala คือ alanine ; Glu คือ glutamic acid ; Gly คือ glycerine ; *L*-DA คือ *L*-diamino acid ; I คือ interpeptide bridge

เชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ *LL* ซึ่งจัดเป็นแอคติโนมัยสีททั่วไป (common *actinomycetes*) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุลลอื่นๆ จัดเป็นแอคติโนมัยสีทหายาก (rare *actinomycetes*) มีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ *meso* แต่มีเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสกุล เช่น *Kitasatospora* มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกทั้งสองแบบ คือ แบบ *LL* และแบบ *meso* นอกจากนี้ยังสามารถพบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy-DAP) ได้ในเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ เช่น ในสกุล *Actinoplanes Ampullariella Dactylosporangium* และ*Micromonospora* ซึ่งกรณีที่พบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซีนั้นมักจะพบควบคู่กับกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่มีความสำคัญในการใช้จัดกลุ่มผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ดังในตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

| Cell wall type | DAB | lysine | ornithine | aspartic acid | glycine | *meso*-DAP | *LL*-DAP | arabinose | galactose |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | | | | | + | | + | | |
| II | | | | | + | +** | | | |
| III | | | | | | + | | | |
| IV | | | | | | + | | + | + |
| V | | + | + | | * | | | | |
| VI | | + | | + | * | | | | |
| VII | + | + | | + | * | | | | |
| VIII | | | | + | * | | | | |

+ คือ แสดงการตรวจพบ, *คือ อาจตรวจพบหรือไม่พบ glycine, **คือ อาจตรวจพบ hydroxyl DAP DAB คือ 2,4-diaminobutyric acid, DAP คือ 2,6-diaminopimelic acid

2.7.2.2 ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ (acyl type)

ผนังเซลล์เปปทิโดไกลแคนประกอบด้วยเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน เรียงสลับกับกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิคโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 กลูโคซิดิก (β-1,4 glucosidic) ในแบคทีเรียบางชนิดอาจพบหมู่ไกลโคลิล (glycolyl group) แทนที่ตำแหน่งของหมู่อะซิติล (acetyl group) ในโครงสร้างของกรดมิวรามิค โดยลักษณะของชนิดไกลโคลิล (glycolyl type) ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียนั้นสามารถพบได้ในเชื้อแอคติโนมัยสีทและแบคทีเรียจำพวกโครีนีฟอร์ม (coryneform bacteria) การศึกษานี้มีประโยชน์ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย การตรวจสอบสามารถทำได้โดยวิเคราะห์สี ทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ในระดับไมโครโมลล์ต่อมิลลิกรัมของเซลล์แห้งได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบปริมาณมักไม่ใช้ในการจัดระบบแบคทีเรีย ชนิดของ acyl ที่พบได้เป็นส่วนมากในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.6

2.7.2.3 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar)

องค์ประกอบของน้ำตาลเป็นข้อมูลที่มักถูกนำไปใช้ในการจำแนก และพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแอคติโนมัยสีท สามารถตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์จะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบภายในเซลล์ รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่พบสามารถช่วยในการจำแนกลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมาก (major) ในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ

| วงศ์ | ชนิดของ acyl |
|---|---|
| *Cellulomonadaceae* | acetyl |
| *Dermatophilaceae* | acetyl |
| *Frankiaceae* | acetyl |
| *Micromonosporaceae* | glycolyl |
| *Mycobacteriaceae* | glycolyl |
| *Nocardiaceae* | glycolyl |
| *Nocardioidaceae* | acetyl |
| *Pseudonocardiaceae* | acetyl |
| *Sporichthyaceae* | acetyl |
| *Streptomycetaceae* | acetyl |
| *Streptpsporangiaceae* | acetyl |
| *Thermomonosporaceae* | acetyl |

ตารางที่ 2.7 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso*

| Type | ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบ |
|---|---|
| A | galactose arabinose<br>no xylose |
| B | madurose<br>no arabinose or xylose |
| C | none |
| D | xylose arabinose |

2.7.2.4 ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับเยื่อหุ้มเซลล์มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ฟอสโฟลิปิดมีลักษณะเป็นแอมฟิพาทิก (amphipatic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic)ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) โครงสร้างพื้นฐาน และคำย่อของฟอสฟอลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรียแสดงไว้ในตารางที่ 2.8 การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดนิยมทำโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ดีเวลอพแบบ 2 ทิศทาง (two-dimention) ซึ่งจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ตรวจพบจะจำเพาะกับรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ โดยชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบสามารถใช้ในการจัดระบบ (systematics) ของแบคทีเรียได้ Lechevalier และคณะ (1981) ได้จัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.9

2.7.2.5 กรดไขมันในเซลล์ (cellular fatty acid)

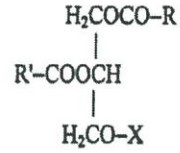
กรดไขมันเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นแอมฟิพาทิก คือ ปลายข้างหนึ่ง (hydrophilic head) ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ และปลายอีกข้างหนึ่ง (hydrophobic tail) ประกอบด้วยกรดไขมัน 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ประเภทของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เยื่อหุ้มเซลล์ของแอคติโนมัยสีทแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดของกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบของกรดไขมันที่พบสามารถใช้ในการจัดระบบของเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ สามารถแยกกรดไขมันที่พบในเซลล์ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) และวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันเทียบกับฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI)

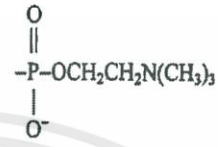
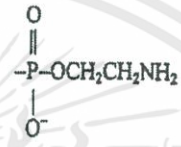
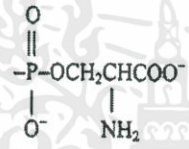
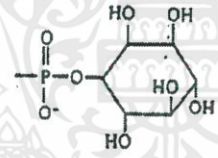
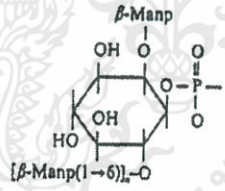
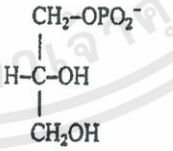
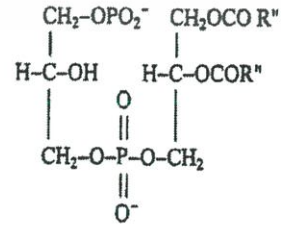
2.7.2.6 ไอโซพรีนอยด์คลิโนน (isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็คตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่พบได้มากที่สุด คือ มีนาควิโนน (menaquinones) และยูบิควิโนน (ubiquinones) (รูปที่ 2.10) ชนิดของควิโนน และจำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene unit) ในสายโซ่ และระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในหน่วยไอโซพรีน ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนก และพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย การตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนน และปริมาณหน่วยของไอโซพรีนทำได้โดยใช้เครื่องแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry, MS) และพบว่าการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin-layer chromatography) สามารถวิเคราะห์ควิโนนได้อย่างรวดเร็ว และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยังใช้แยก และตรวจสอบองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อย รวมทั้งยังใช้สำหรับการวิเคราะห์ควิโนนในเชิงปริมาณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย



| ชนิดของฟอสโฟลิปิด | ตัวย่อ | X |
|---|---|---|
| Phosphatidylcholine | PC |  |
| Phosphatidylethanolamine | PE |  |
| Phosphatidylserine | PS |  |
| Phosphatidylinositol | PI |  |
| Phosphatidylinositolmannosides | PIMs |  |
| Phosphatidylglycerol | PG |  |
| Diphosphatidylglycerol | DPG |  |

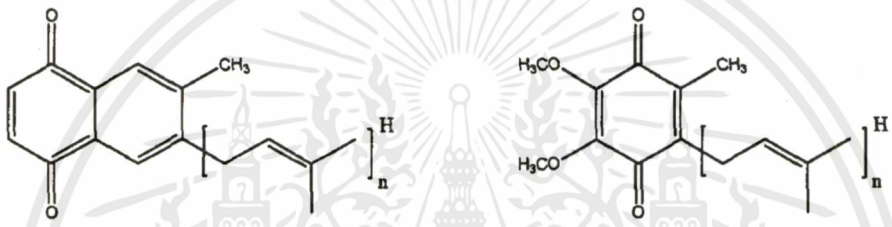
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีท

| Phospholipid pattern | PE and its derivatives | PC | GluNU |
|---|---|---|---|
| PI | - | - | - |
| PII | + | - | - |
| PIII | V | + | - |
| PIV | + | - | + |

GluNU คือ glucosamine containing phospholipid

V คือ variation




**menaquinone** **ubiquinones**

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย

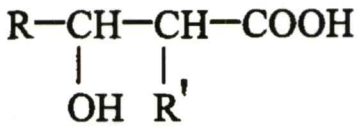
n คือ จำนวนหน่วยของไอโซพรีน

H คือ จำนวนอะตอมของไฮโดรเจนที่เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนสในพันธะคู่

2.7.2.7 กรดมัยคอลิก (mycolic acid)

กรดมัยคอลิก คือ กรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (2-alkyl-3-hydroxy fatty acids) (รูปที่ 2.11) ประกอบด้วยคาร์บอน 24-90 อะตอม มักพบในสกุล *Mycobacterium Nocardia Rhodococcus* และ*Corynebacterium* กรดมัยคอลิกจะพบอยู่ในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์ชนิดที่ IV (มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมิลิกเป็นแบบ *meso* ที่ผนังเซลล์ มีน้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตสภายในเซลล์) กรดมัยคอลิกสามารถใช้ในการจำแนกชื้อในระดับสกุลได้ กรดมัยคอลิกที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น ไกลโคลิปิด (glycolipids) ฟีโนลิกไกลโคลิปิด (phenolic glycolopids) หรือไกลโคเปปติโดลิปิด (glycopeptidolipids)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของกรดมัยคอลิก

R คือ คาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

R' คือ หมู่แอลคิล

**2.7.3 ลักษณะทางจีโนไทป์**

ข้อมูลในสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อการศึกษาการจัดระบบ (systemetic) ของเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างมาก การศึกษาระบบของแบคทีเรียมักนิยมศึกษาข้อมูลของ 16S rRNA gene บนสายดีเอ็นเอ เพื่อสืบหาสายวิวัฒนาการของเชื้อโดยการวิเคราะห์จากต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) การศึกษา 16S rRNA gene นี้มีกระบวนการ ดังนี้

2.7.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเวลาอันสั้น อาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น โดยอาศัยต้นแบบสายสั้นๆ ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) และคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงต่ำตามความต้องการ โดยที่ไม่ทำให้เอนไซม์นี้เสียความสามารถในการทำงาน

ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3'
3. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) คือ dATP aTTP dGTP และ dCTP
4. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase)
5. โคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ได้แก่ $Mg^{2+}$และ $Mn^{2+}$

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1) การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation)

เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบเกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สองสายที่พันกันเป็นเกลียวดีเอ็นเอแยกออกจากกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่กล่าวถึงนี้ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบส (%G+C content) ในสายดีเอ็นเอทำให้ความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกัน

2) การเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (annealing)

เป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อให้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิประมาณ 52 ถึง 58 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (melting temperature, TM) ของสายดีเอ็นเอไพรเมอร์

3) การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension)

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5’ ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 ถึง 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอน

กระบวนการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะเป็นการดำเนินของขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งเมื่อครบประมาณ 30 รอบจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็น $2^{30}$ หรือประมาณ $10^{9}$ โมเลกุล โดยทั่วไปนิยมใช้ 20 ถึง 35 รอบ

2.7.3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดกันมากพอที่จะมีดีเอ็นเอที่คล้ายกันมาก แต่ก็ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ไรโบโซมเป็นโครงสร้างเล็กๆ ภายในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีน และไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) สร้างโดยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ในแบคทีเรียทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานานแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนไปน้อยมาก ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตสองตัวจะมีความใกล้ชิดกันน้อยและไม่มีดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่ก็ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) คล้ายกัน ความคล้ายคลึงกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับสกุล (genes) วงศ์ (family) และอันดับ (order) ความคล้ายคลึงกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) และไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แคตตาล็อกกิ้ง (rRNA oligonucleotide cataloging) เป็นวิธีใหม่ที่ใช้หาความคล้ายคลึงกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการตรวจหาลำดับเบสบนดีเอ็นเอช่วยในการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งต่างๆ วิธีการตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอมีหลายวิธี วิธีที่เป็นที่นิยมเป็นกระบวนการของ Sanger ซึ่งอาศัยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อสายดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอสายสั้นๆ จากนั้นติดฉลากสารรังสีที่มีความจำเพาะกับเลสแต่ละชนิดที่ปลายของดีเอ็นเอ และตรวจสอบลำดับเบส โดยอาศัยการแยกสายดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นเจลที่ทำด้วยพอลิเอคริลเลไมด์ (polyacrylamide gel electrophoresis) ปัจจุบันมีเครื่องมือสำเร็จรูปทำให้การหาลำดับเบสนี้ทำได้สะดวกรวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น การติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสแต่ละชนิดอาศัยสารไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide : ddG ddA ddT ddC) ที่ทำให้เกิดสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีสีแตกต่างกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว และไม่ต้องใช้สารรังสี

2.7.3.3 ปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยคู่ของเบส คือ กวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) และอะดีนีน (A) คู่กับไทมีน (T) จำนวนของนิวคลีโอไทด์เบสในดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละของกวานีนกับไซโตซีนรวมกันที่เรียกว่า mol% G+C ค่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ในสปีชีส์ที่ใกล้กันจะมี mol% G+C คล้ายกันมาก ถ้าสิ่งมีชีวิตมี mol% G+C ต่างกันมากแสดงว่าไม่ค่อยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ก็อาจมีบางกรณีที่สิ่งมีชีวิตที่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลย แต่มี mol% G+C คล้ายกันก็ได้

2.7.3.4 ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA Hybridization)

ถ้าให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) แต่ละสายของดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันจะแยกออกเพราะพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ถูกทำลาย และเมื่อทิ้งให้เย็น สายของดีเอ็นเอจะกลับมาจับคู่กัน (base pairing) กันได้อีก โดยอาศัยหลักการจับคู่เบสของดีเอ็นเอ ซึ่งใช้หลักการนี้ในการศึกษาหาความคล้ายกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ถ้าสิ่งมีชีวิตสองชนิดนั้นมีความคล้ายคลึงกันมากหรือใกล้ชิดกันมาก ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองจะสามารถจับคู่กัน (hybridize) ได้ ดังนั้น ในการศึกษาหาความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองมาให้ความร้อนให้แปลงสภาพ (denature) เพื่อแยกออกเป็นสายเดี่ยวๆ แล้วเอาสายเดี่ยวนั้นมาผสมกัน ทิ้งให้เย็น ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้มีความคล้ายคลึงกันหรือใกล้เคียงกันจะเกิดการจับคู่ของสายดีเอ็นเอ (heteroduplex) คือสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งจับคู่กับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้งสองไม่ใกล้ชิดกันเลย จะไม่เกิดการจับคู่กันของสายดีเอ็น วิธีนี้ใช้ทดสอบในระดับสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย

ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดี คือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์สารสี หรือสารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยสีท ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990) เอนไซม์ที่แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ ไซลาเนส เซลลูโลส อะไมเลส และไคติเนส เป็นต้น เอนไซม์อะไมเลสที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายจีนัสที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ได้แก่ *Micromonospora, Nocardia* และ *Streptomyces* เอนไซม์อะไมเลสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือการผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ไคติเนสที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา หรือเป็นองค์ประกอบของ exoskeleton ของพวก arthropod จีนัสที่สามารถผลิต chitinase ได้แก่ *Streptomyces* เอนไซม์ไคติเนสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ เช่น นำมาทำ protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ การนำมาเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เช่น ใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และการนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเล เป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น

### 2.8.1 สร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารปฏิชีวนะกว่า 10,000 ชนิดที่รู้จัก ผลิตโดยจุลินทรีย์ สัดส่วน 2 ใน 3 ผลิตโดย จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีท และ 74 เปอร์เซ็นต์ มาจากแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* รองลงมาคือ สกุล *Actinomadura* และ *Micromonospora* แอคติโนมัยสีทหลายชนิด โดยเฉพาะจีนัส *Streptomyces* มีรายงานว่าสามารถสร้าง protease inhibitor ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง human immune-deficiency virus type1, cytomegalovirus และไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

Mycostop เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ทางการค้าซึ่งมี *Streptomyces griseoviridis* เป็นองค์ประกอบ นำมาประยุกต์ใช้กับระบบชลประทาน เพื่อควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* และ*Alternaria brassicicola*

จุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ

การสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญของแอคติโนมัยสีท พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทมีการสร้างขึ้นในช่วง idiophase ของการเจริญ สารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นพบว่าเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ มักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็นวงศ์ (family) หรือ กลุ่ม (series) ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบกะ (batch culture) โดยเฉพาะเชื้อในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture (Vegetative) ลงในอาหารในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้า ๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมีเมตาบอลิซึม และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์

การแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้เป็น 9 กลุ่มใหญ่ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ

1.กลุ่มที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (cell wall)

ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเพนิซิลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) แวนโคมัยซิน (vancomicin) เบซิเตรซิน (basitracin) และ ไซโคลเซอรีน (cycloserrine) โดยยากลุ่มนี้มีผลทำลายผนังหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก และตายจึงจัดเป็นยากลุ่มที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง (bactericidal action)

2.กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

ยากลุ่มนี้มีผลทำให้ของเหลวภายในเซลล์ซึมออกมาภายนอกเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymtxin) โคลิสติน (colistin) และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B)

3.กลุ่มที่มีผลขัดขวางการสร้างโปรตีน

ยากลุ่มนี้มีผลยับยั้งการทำงานของไรโบโซม (ribosome) ซึ่งเป็นกลจักรที่สำคัญของเซลล์ในการสร้างโปรตีน จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic action) โดยไม่มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของภูมิต้านทานของร่างกายในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ ยากลุ่มนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลต่อไรโบโซมชนิด 50 เอส (50S) ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (chloranphenicol) คลินดามัยซิน (clindamycin) และอิริโธมัยซิน (erythromycin) ส่วนกลุ่มที่มีผลต่อไรโซโซมชนิด 30 เอส (30S) ได้แก่ เตราซัยคลิน (tetracycline)

4.กลุ่มที่มีผลทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนผิดปกติ

เกิดจากการที่ยาจับกับไรโบโซมชนิด 30 เอส (30S) และทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติเป็นผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลาย ยาจึงมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโดยตรง ยากลุ่มนี้ได้แก่ สเตรปติโนมัยซิน (streptinomycin) อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) กานามัยซิน (kanamycin) และนีโอมัยซิน (neomycin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.กลุ่มที่มีผลการยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

ยากลุ่มนี้ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ จึงมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไรแฟมฟิน (rifampin) เมโทรนิดาโซล (metronidazole) และยาในกลุ่มควิโนโลน (quinolone)

6.กลุ่มที่ขัดขางกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์

ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และไตรเมโทพริม ซึ่งจะไปยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิค ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถแจริญเติมโต และแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

7.กลุ่มที่มีผลการยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

ยากลุ่มนี้ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ จึงมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไรแฟมฟิน (rifampin) เมโทรนิดาโซล (metronidazole) และยาในกลุ่มควิโนโลน (quinolone)

8.กลุ่มที่ขัดขางกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์

ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และไตรเมโทพริม ซึ่งจะไปยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิค ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถแจริญเติมโต และแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

9.กลุ่มที่ขัดขางกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์

ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และไตรเมโทพริม ซึ่งจะไปยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิค ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถแจริญเติมโต และแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

**2.8.2 ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer)**

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิต extracellular enzyme ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane ($\gamma$-hexachloro cyclohexane) แอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น สารประกอบจำพวก chlorobenzene, dichlorobenzene และphenol รวมทั้งของเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น 1,4-dioxane และสามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด Polytetramethylene succinate (PTMS) แอคติโนมัยสีท หลายชนิดสามารถทน และดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น แอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* และ *Amycolatopsis* สามารถทนต่อสารประกอบโครเมียม (Cr (VI)) และสะสมสารดังกล่าวไว้ในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาใช้บำบัดการปนเปื้อนโครเมียมในสิ่งแวดล้อมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์และวิตามิน

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เอนไซม์ transglutaminase ซึ่งผลิตโดย *Streptoverticillium* และ*Streptomyces* มีประโยชน์ในการนามาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ เอนไซม์กลูโคอะไมเลสทนร้อนซึ่งผลิตโดย *Streptosporangium* sp. ที่คัดแยกจากใบข้าวโพด ซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อการนำมาประยุกต์เพื่อปรับปรุงอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง เอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ผลิตโดย *Thermomonospora fusca* BD25 และ *Streptomyces cyaneus* SN32

แอคติโนมัยสีทสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น Streptomyces olivaceus ผลิตวิตามิน B12 มีรายงานว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบราก รากและดินอิสระสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไทอะมีน ไรโบฟลาวิน ฟลาโวโปรตีน วิตามินบี 12 และโค-เอนไซม์ เอ สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron และalachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง การคัดแยกแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* จากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลส้ม (Citrus limon และ *C. sinensis*) และคัดแยกได้ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ polyethers, azalomycin B และ nonpolyenic macrolide antibiotics

การประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol)

มีการศึกษาการใช้แอคติโนมัยสีทเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมแบคทีเรีย และเชื้อราที่ก่อโรคพืชหลายชนิด เช่นการคลุกดินด้วยสปอร์ของแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* สามารถควบคุมโรครากเน่า และลดจำนวนพยาธิตัวกลม (nematode) ในถั่วอัลฟัลฟาได้ การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชด้วยสปอร์หรือน้ำเลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยสีทสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ เช่น เมื่อนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้มีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค damping off และroot rot ที่เกิดจาก *R. solani* ในถั่ว และมะเขือเทศด้วยเช่นกัน แอคติโนมัยสีทที่อาศัยบริเวณดินรอบรากพืชพบว่ามีบทบาท ช่วยส่งเสริมการเจริญแก่พืช ช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ที่มีรายงานไว้ เช่น *Micromonospora carbonacea* สามารถเข้าอยู่อาศัยในรากกะหล่ำ และในดินห่างจากบริเวณรอบราก 4 เซนติเมตร และช่วยป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotinia minor*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.10 เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

| เชื้อจุลินทรีย์ | สารประกอบ | ฤทธิ์ทางชีวภาพ |
|---|---|---|
| *Actinomadura carminata* | Carminomycin | Antitumour |
| *Saccharopolyspora erythraea* | Erythromycin | Broad-spectrum antibiotic |
| *S. albovinaceus* | Rifamycin B | Antiviral |
| *S. aureofaciens* | Tetracycline | Antibiotic |
| *S. avernmitilis* | Avermectin | Veterinary antiparasitic drug |
| *S. clavuligerus* | Clavulanic acid | Inlilbits $\beta$-lactamase activity |
| *S. griseus* | Candicidin | Antifungal |
| *S. griseus* | Cycloheximide | Antifungal, used in agriculture |
| *S. griseus* | Stretomycin | Antibiotic |
| *Amycolatopsis mediterranei* | Rifamicins | Antibiotic |
| *S. nodosus* | Amphotericin B | Antifungal |
| *S. noursei* | Nystatin | Antifungal |
| *A.orientalis* | Vancomycin | Antibiotic |
| *S. peucetius* | Daunorubicin HCI | Antitumour |
| *S. rimosus* | Oxytetracycline | Antibiotic |
| *S. venezuelae* | Chloramphenicol | Broad-spectrum antibiotic, |
| *S. verticillus* | Bleomycin sulfate | Antiviral<br>Antifumour, used in the treatment<br>Of lymphomas |
| *S. fradiae* | Tylosin | Growth promotion |
| *S. hygroscopicus* | Bialaphos | Herbicide |
| *S. hygroscopicus* | Herbimycin | Herbicide |
| *S. cinnamonensis* | Monensi | Growth promotion |

ที่มา : วิพัฒน์ และเอกภพ, 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

El-Tarabily และคณะ (2008) รายงานว่า *Micromonospora endolithica* ที่คัดแยกจากดินและมีความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในรากและดินรอบรากต้นถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) สามารถละลายฟอสเฟตในดินในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่ว

El-Abyad และคณะ (1993) เคลือบเมล็ดมะเขือด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ก่อนนำไปปลูก พบว่าสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดี นอกจากนี้น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* และ*S. Canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์จาก *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Verticillium alboatrum* และ*Alternaria solani* และยังมีการศึกษาการใช้ สเตรปโตมัยสีทควบคุมเชื้อราก่อโรคที่ราก และเชื้อราก่อโรคในเมล็ด

**2.8.3 บทบาทและการประยุกต์ใช้เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท**

แอคติโนมัยสีทที่เข้าอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้รับอาหาร และการป้องกันจากพืชอาศัย ในขณะเดียวกันพืชอาศัยก็ได้รับประโยชน์จากแอคติโนมัยสีท โดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท สามารถสร้างสารเมทาบอไลต์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolite) ช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นพืช บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นพืชหรือสร้างไฟโตฮอร์โมน (phytohormone) ช่วยให้พืชทนต่อการเกิดโรค (disease resistance) และป้องกันเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ หรือ siderophore และแข่งขันกันแย่งอาหารระหว่างแอคติโนมัยสีทและเชื้อก่อโรคอื่นๆ สารเมแทบอไลท์ที่สร้างโดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ได้แก่ novobiocin และcedarmycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. ที่คัดแยกจาก *Aucuba japonica* และ*Cryptomeria japonica* ตามลำดับ สารปฏิชีวนะ alumycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ในกลุ่ม anphthoquinone ซึ่งผลิตโดย *Streptomyces* sp. ที่คัดแยกจากปมรากของ *Alnus glutinosa* ในประเทศเยอรมัน เป็นต้น

สารเมแทบอไลท์ที่สร้างโดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีรายงานว่ามีบทบาทช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช ได้แก่ pteridic acid A และB ซึ่งสร้างออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 ที่คัดแยกมาจากลาต้นเฟิร์น (*Pteridium aquilinum*) สารดังกล่าวทำหน้าที่คล้ายออกซิน และกรดอินโดลอะซิติก ช่วยกระตุ้นความยาวของรากและเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างรากในส่วนของ hypocotyls ในถั่ว kidney bean นอกจากนี้มีรายงานว่า *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1 สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับ *Frankia*

**2.8.4 แอคติโนมัยสีทในดิน**

โดยทั่วๆ ไปไม่ถือว่าแอคติโนมัยสีทจะมีอยู่มากในดินเท่านั้น แต่จะมีอยู่ในปริมาณมากในกองปุ๋ยหมัก หรือวัตถุเน่าเปื่อยอื่นๆ ในดินใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบด้วย ในดินจุลินทรีย์พวกนี้จะอยู่ในปริมาณมาก ทั้งดินชั้นบน และดินชั้นล่าง แม้แต่ในส่วนลึกมากๆ ลงไปของหน้าตัดดิน ก็ยังปรากฏว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทอาศัยอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของแอคติโนมัยสีทในดิน นับได้ว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณมากใกล้ๆ กับปริมาณของแบคทีเรีย หรืออาจต่ำกว่าบ้างเพียงเล็กน้อย ปัจจัยที่ควบคุมปริมาณของแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสมบัติทางฟิสิกส์ของดิน ปริมาณอินทรียวัตถุ ความเป็นกรด-ด่างของดิน จากรายงานการประเมินโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง $10^5$ ถึง $10^8$ เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่สูงหรือต่ำกว่าปริมาณโดยเฉลี่ยมักพบอยู่เสมอ เช่น ในดินป่าบางแห่ง หรือ ดินที่มีเกษตรกรรม มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีความเป็นด่างพอควร และค่อนข้างแห้ง จะมีเชื้อแอคติโนมัยสีทค่อนข้างสูง โดยทั่วๆ ไปมักพบแอคติโนมัยสีทในทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์สูงกว่าในดินที่ทำการเกษตรกรรมอื่นๆ และดินในเขตแห้งแล้งมากกว่าในเขตชุ่มชื้น

การประเมินปริมาณแอคติโนมัยสีทอาจทำได้ทั้งวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือใช้วิธีนับจากจานเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีหลังเป็นวิธีที่ให้ผลดีกว่าวิธีแรก การนับปริมาณโดยวิธี plate count อาจทำไปพร้อมกันกับการนับปริมาณแบคทีเรียในเพลทเดียวกัน ทั้งนี้เพราะแอคติโนมัยสีท ขึ้นได้ในอาหารชนิดที่มีอินทรีย์สารผสมอยู่ และมักขึ้นหลังจากที่แบคทีเรียขึ้นแล้ว จึงสะดวกต่อการนับประกอบกับลักษณะของโคโลนีก็มีความแตกต่างจากแบคทีเรียเป็นอันมาก คือลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียมักจะมีลักษณะใส เป็นวงกลม ผิวของขอบโคโลนีเรียบ ส่วนของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะทึบ เป็นวงกลมเช่นเดียวกัน แต่ผิวของขอบโคโลนีจะขรุขระ การนับปริมาณของแอคติโนมัยสีท โดยวิธีดังกล่าวนี้นับว่ายังมีข้อเสียอยู่มาก เพราะขณะที่ทำให้ดินเจือจาง นั่นต้องมีการเขย่า ถ้าเขย่าแรงๆ mycelium อาจจะแตกหักออกได้ ส่วนที่แตกหักออกจะงอก และเจริญเป็นโคโลนีปรากฏในอาหารด้วย จึงทำให้ค่าที่ได้มากกว่าค่าความจริง ทำให้วินิจฉัยธรรมชาติหรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดนี้ในดินได้ผิดจากความจริง อีกประการหนึ่ง สำหรับชนิดที่สร้าง conidia ได้ บางครั้งจะปรากฏอยู่ในรูปดินในรูปของ conidia เสียเป็นส่วนใหญ่ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับนับ conodia มักจะเจริญเป็นโคโลนียาก จึงทนอยู่ในดินเป็นเวลานาน แม้ดินจะมีสภาพไม่เหมาะสม เช่น สภาพขาดน้ำ แห้งแล้ง ฯลฯ ค่าที่ได้มักจะต่ำกว่าความเป็นจริงด้วยเหตุนี้จึงมีอุปสรรคนานัปการดังกล่าวนี้ วิธีการประเมินปริมาณแอคติโนมัยสีทในดินจึงมีความจำเป็นต้องได้รับการค้นคว้า วิจัยเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมต่อไป และเป็นสิ่งที่ท้าทายนักจุลชีววิทยาของดินในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่ง

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จิราพร และคณะ (2554) ได้ศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลต ได้แก่ KL-A-5-2 KL-B-2-11 และKL-B-3-3 ถูกแยกจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และ10 ไอโซเลต ได้แก่ BK1-2 BK1-4 BK2-1 BK2-2 BK2-7 BK5-11 BK9 G17 G20-4 และNON6-2 แยกจากดินบริเวณจังหวัดกรุงเทพมหานคร เชื้อเหล่านี้ถูกกำหนดโดยการวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ และลักษณะทางจีโนไทป์ซึ่งวิเคราะห์ลำดับของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA gene บางส่วน สามารถจำแนกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกเป็น 4 สกุล คือ *Streptomyces Actinomadura Micromonospora* และ*Nocardia* น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีการเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) และ เอการดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 8 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 61.54) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST20654 และ*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า เชื้อ แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทางด้านเภสัชกรรมได้ในอนาคต

นภาวัลย์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาการคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายพลาสติกโพลีคาโพรแลคโตน (PCL) เมื่อนำแอคติโนมัยสีทที่ทำการศึกษาทั้งหมด 323 ไอโซเลต แบ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินที่มีทับถมของเศษพลาสติก 268 ไอโซเลต พบว่าแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยพลาสติกได้มี 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต 266C วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 1.18 เซนติเมตร นอกจากนี้เชื้อไอโซเลต 266C ยังสามารถย่อยสลายไตรบิวทีรีนและปาล์มได้อีกด้วย ในการย่อยสลายไตรบิวทีรีนและน้ำมันปาล์ม ของ แอคติโนมัยสีท คิดเป็นร้อยละ 87.29 และ57.27 ตามลำดับ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ย่อยสลายไตรบิวทีรีน ได้อย่างมีประสิทธิภาพมี 6 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อไอโซเลต 62C 67C 72C 172C 178C และ 217C วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 0.7 เซนติเมตร 0.9 เซนติเมตร 0.94 เซนติเมตร 0.72 เซนติเมตร 0.97 เซนติเมตร และ 0.49 เซนติเมตร ตามลำดับ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์มมี 6 ไอโซเลต ได้แก่ 4B 131C 226C 251C 252C และ 285C เมื่อนำแอคติโนมัยสีททั้ง 13 ไอโซเลตมาทำการจัดจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 13 ไอโซเลต มีลักษณะสปอร์คล้ายคลึงกับเชื้อแอคติโนมัยสีทในวงศ์ *Streptomycetaceae* สกุล *Streptomyces*

เกษม และคณะ (2547) ได้ศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 28 ไอโซเลต ที่แยกจากดินบริเวณสระมรกต จังหวัดกระบี่ ดินบริเวณน้ำตกนางรอง จังหวัดนครนายก และดินเพาะปลูกพืชเขตตลิ่งชัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร ลักษณะทั่วไปของเชื้อเหล่านี้ถูกกำหนดโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces,Micromonospora* และที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้

วิจิตรา (2545) ทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีท 100 ไอโซเลตที่แยกจากดิน 35 ตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งของเกาะเสม็ดจังหวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยอง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อที่แยกได้ 80 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยสีท และอีก 20 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลไมโครโมโนสปอร่า การคัดเลือกขั้นต้นพบว่าสเตรปโตมัยซีส 55 ไอโซเลต และไมโครโมโนปอร่า 14 ไอโซเลตสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้โดยส่วนใหญ่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีและมีบางไอโซเลตสามารถสร้างสารต้านเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ การคัดเลือกขั้นที่สองพบว่าสายพันธุ์ PC 4-3 ที่ให้ผลดีในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพถูกคัดเลือกเพื่อการหมักสารทุติยภูมิสายพันธุ์นี้มี *L*-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และสายวิวัฒนาการพบว่ามีความใกล้เคียงกับสเตรปโตมัยสีทสายพันธุ์ NRRL B-1865 สิ่งสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากน้ำหมักของสายพันธุ์นี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923, *B.subtilis* ATCC 6633 และ*C.albicans* ATCC 10231ได้ เมื่อทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีพร้อมการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสามารถแยกได้สารในกลุ่ม ansamycins ที่เคยพบแล้ว 2 ชนิดคือ geldanamycin และ17-O-demethylgeldanamycin การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล UV, IR, MS และ NMR spectroscopy ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานว่าสาร geldanamycin แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ*C.albicans* ATCC 10231

กรรณิการ์ (2009) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินรอบรากข้าวและรากพืชได้ แอคติโนมัยสีททั้งหมด จำนวน 210 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกออกตามกลุ่มสีของสปอร์สามารถจัดได้เป็น 7 กลุ่มสี ตาม ลักษณะสีสปอร์ โดยกลุ่มสปอร์สีเทามีสมาชิกจำนวนมากที่สุด (62 เปอร์เซ็นต์) จากการวิเคราะห์ ชนิดของ diaminopimalic acid ในเซลล์ที่ผ่านการย่อยพบว่า 163 ไอโซเลตพบ *LL*-diaminopimelic acid และ47 ไอโซเลทพบ *meso*-diaminopimelic acid ซึ่งจัดจำแนกไอโซเลตที่คัดแยกได้เป็นกลุ่ม *streptomycete* และnon-*streptomycete* ตามลำดับ เมื่อนำตัวแทนกลุ่มของไอโซเลตที่เป็น nonstreptomycete มาระบุชนิดด้วยการศึกษายีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลตเหล่านี้จัดอยู่ในจีนัส *Actinomadura, Actinopolymorpha, Amycolatopsis, Microbispora, Micromonospora, Nocardia, Nonomuraea* และ*Sphaerisporangium* เมื่อทดสอบความสามารถของไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด ในการยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TB 003 ด้วยวิธี overlay method และทดสอบการยับยั้ง *Fusarium proliferatum* DOAC 0842, *Helminthosporium oryzae* DOAC 1570 และ *Rhizocthonia solani* DOAC 1406 ด้วยวิธี dual culture plate assays พบว่า 141 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae* และมีจำนวน 122, 88 และ78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Fusarium proliferatum, Helminthosporium oryzae* และ *Rhizocthonia solani* ได้ตามลำดับ ทั้งนี้มี 41 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกชนิด และไอโซเลต K8S3 ซึ่ง จากการศึกษายีน 16S rRNA พบว่าเหมือนกับ *Streptomyces hygroscopicus* เป็นไอโซเลตที่มี ความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และเป็นไอโซเลตที่มีผลส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาใช้ต่อไป

จิตติ (2010) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 121 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินบริเวณภูเขาทางภาคตะวันตกและดินป่าชายเลนในจำนวนเชื้อทั้งหมดนั้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 57 ไอโซเลตที่มีกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งเชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น 12 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นเป็นสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Agromyces, Dactylosporangium, Micromonospora, Microbispora และPlanotetraspora* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต TJ2-2 และCM9-9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปของเชื้อสกุล *Micromonospora* และ *Agromyces* ตามลำดับ แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* และ *Agromyces* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต TJ2-2 และ CM9-9 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Micromonospora* และ*Agromyces* โดยให้ชื่อว่า *Micromonospora pattaloongensis* และ *Agromyces tropica* นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 40.3 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในบริเวณป่าชายเลน และดินภูเขาทางภาคตะวันตกของประเทศไทยมีค่อนข้างสูงและควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อไป

จิตติ (2547) ทำการศึกษาเพื่อหาสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุจังหวัดตรัง พัทลุง ยะลา และนราธิวาส พบว่าสามารถแยกเชื้อที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยได้จำนวน 52 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และทางอนุกรมวิธานเคมีรวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA จึงสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ได้เป็นแบคทีเรียในสกุลไมโครโมโนสปอราพบว่าเชื้อที่แยกได้มีกรด *meso*-diaminopimelic ในผนังเซลล์ มีน้ำตาล xylose และarabinose และพบ phospholipid ชนิด phosphatidylethanolamine เป็นองค์ประกอบหลักรวมทั้งมีกรดไขมันส่วนใหญแบบ *iso*-C(,16:0), *iso*-C(,15:0) *iso*-C(,17:0), *anteiso*-C(,16:0) *anteiso*-C(,15:0) และ*anteiso* C(,17:0) และมี menaquinones ชนิด MK-9(H(,4)), MK-9(H(,6)) หรือ MK-10(H(,4)) นอกจากนี้พบว่ามีปริมาณ G+C ของสาย DNA อยู่ในช่วง 71-73 mol% จากผลของความคล้ายคลึงทาง DNA และลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการสามารถแบ่งแยกเชื้อเหล่านี้ได้เป็น 11 กลุ่ม และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อกลุ่มที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(8 สายพันธุ์) และกลุ่มที่ 3 (7 สายพันธุ์) เป็น *M. chalcea* และ*M. aurantiaca* ตามลำดับ สำหรับเชื้อไมโครโมโนสปอรา 9 กลุ่ม ที่เหลือแสดงผลของความคล้ายคลึงทาง DNA (12.9-53.1%) และลำดับเบสในช่วง 16S rDNA (97.5-99.2%) ในระดับต่ำรวมทั้งมีลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างไปจากเชื้อไมโครโมโนสปอราที่เคยมีรายงานไว้จึงสามารถจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ และได้เสนอชื่อสำหรับเชื้อกลุ่มที่ 7 (2 สายพันธุ์) และกลุ่มที่ 11 (1 สายพันธุ์) เป็น *Micromonospora eburnea* และ *Micromonospora aurantionigra* ตามลำดับ จากการศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อที่คัดเลือกสายพันธุ์ TT1-11 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสามารถแยกสิ่งสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากน้ำหมักเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟีได้สารใหม่พวก polyene macrolide lactam 1 ชนิด คือ Micromonopsprin A (9, 11, 13-trihydroxy-14, 19, 24-trimethyl-1-azacyclotetracosa-3,5,7,15,17,19,21-heptaen-2-one) นอกจากนี้ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างของสารใหม่นี้ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่นได้สารอนุพันธ์อีก 1 ชนิด คือ 9,11,13-trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracosan-2-one การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล UV, IR, MS และ NMR spectroscopy สาร Micromonosporin A นี้ไม่เสถียร และไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ อย่างไรก็ตามสารอนุพันธุ์ที่เตรียมได้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างอ่อน และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย Plasmodiumfalciparum (K1, multidrug-resistant strain) ที่ระดับ IC(,50) = 3.1 (+,m) กรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อวัณโรคที่ระดับ MIC = 50 (+,m) กรัมต่อมิลลิลิตร

เกศแก้วกัลยา และคณะ (2555) การคัดกรอง และการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ เชื้อที่ถูกคัดแยกมาจากดินบริเวณน้ำตกในอุทยาน นำมาวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธาน คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ และวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene สามารถจำแนกเชื้อได้ 2 สกุล คือ *Streptomyces* และ *Micromonospora* และนำเชื้อที่ถูกทดสอบนำมาศึกษากิจกรรมต่างๆ ซึ่งมีความสำคัญมากเกี่ยวกับด้านทางเภสัชกรรม และด้านเกษตรกรรมสามารถนำไปพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในอนาคตได้

ดุษฎี และคณะ (2555) เชื้อแอคติโนมัยสีทบนพื้นผิวที่แยกจากต้นข้าว (*Oryza sativa* L.) และกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อนั้น โดยหาเชื้อได้เป็นจำนวน 50 ไอโซเลตจากดินบริเวณต้นข้าว และตัวอย่างใบข้าวที่จังหวัด สุพรรณบุรี อ่างทอง อยุธยา และปทุมธานี ได้นำมาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะการเจริญ และทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ต่างๆ เบื้องต้น และสามารถหาจุลินทรีย์ทดสอบที่สามารถต้านโรคที่เกิดขึ้นในข้าวได้ นำมาวิเคราะห์ลำดับเบส ในช่วง 16S rRNA gene และวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อทดสอบเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุฑามาศ และคณะ (2554) อนุกรมวิธานและองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อไมโครโมโนสปอรา ได้ศึกษาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่าเชื้อในสกุล *Micromonospora* มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora tulbaghiae* มากที่สุด ดังนั้นจึงได้หาว่าเชื้อดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดใดบ้างโดยการวิเคราะห์ทางเคมี

Hamaki และคณะ (2005) พบเชื้อแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ได้ใช้กันโดยทั่วไป อาหารชนิดนี้ประกอบด้วยสารสกัดจากดิน (soil extract) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 15 กรัมต่อลิตร และไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมอาหารสารสกัดจากดิน (soil extract) ทำโดยใช้ดิน 1 กิโลกรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร บ่มไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง นำไปกรอง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที นำส่วนใสมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เมื่อเชื้อเจริญทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยการตรวจดูโคโลยนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้เชื้อแอคติโนมัยสีท 6 สายพันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการศึกษาสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าเชื้อที่แยกได้มีแนวโน้มเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Actinomadura* จำนวน 2 สายพันธุ์ สกุล*Streptosporangium* จำนวน 1 สายพันธุ์ และสกุล*Acrocarpospora* จำนวน 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ พิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Microbacterium cookie* และ*Frankia* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

### 3.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ได้มาจากนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2556 ได้แก่

1. *45
2. PCWR-4-6
3. DH51B-4-3
4. PN51B-9-4

### 3.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

#### 3.2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทลงบนอาหารสูตรดัดแปลงซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar, modified) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ ตรวจดูลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

#### 3.2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยการเลี้ยงลงบนอาหารกลูโคสแอสพาราจีน เอการ์ (glucose asparagine agar) (ภาคผนวก ก) อาหารนิวเทรียนท์ เอการ์ (nutrient agar) (ภาคผนวก ก) และอาหารต่างๆตาม International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling และGottlieb. 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar, ISP2) อาหารโอทมีล เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) (ภาคผนวก ก) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salt – starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์ (glycerol-asparagine agar, ISP5) (ภาคผนวก ก) อาหารเปปโตน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์ (peptone-yeast extract iron agar, ISP6) (ภาคผนวก ก) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) (ภาคผนวก ก) โดยการทำเป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) หรือสารละลายเซลล์ (cell suspension) แล้วหยดลงบนอาหารต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยดูการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-IBCC color system) (Kelly. 1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี**

3.2.3.1 การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล เอการ์ (basal agar medium, ISP9) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบกับชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

(1) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)

(2) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นปานกลาง (±)

(3) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-มอลโตส (D-maltose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล (glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.2.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง (starch hydrolysis)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salt-starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำสารละลายไอโอดีนลาดลงบนผิวอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.2.3.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวบูลอิลลอน เจลาติน (bouillon gelatin broth) (ภาคผนวก ก) (Arai. 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจผลโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

3.2.3.4 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวเปปโตน โพแทสเซียมไนเตรต (peptone $KNO_3$) (ภาคผนวก ก) (Arai. 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ปริมาตร 2 หยด (ภาคผนวก ข) และสารละลายไดเมทิลแนปทิลลามีน (*N, N*-dimethyl-1-naphthylamine) ปริมาตร 3 หยด (ภาคผนวก ข) หากมีการเปลี่ยนรูปไนเตรตเป็นไนไตรต์สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

3.2.3.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

1. นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวสกิมมิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้อาหารจะมีลักษณะใส

2. นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวสกิมมิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) (Gordon และ คณะ. 1974) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.2.3.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 2 3 4 5 6 และ7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.2.3.7 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.2.3.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.9 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

(acid production from carbohydrates)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล อินออร์แกนิก ไนโตรเจน (basal inorganic nitrogen medium) (ภาคผนวก ก) (Gordon และคณะ. 1974) ที่เติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบโดยหากเชื้อสามารถสร้างกรดได้อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) น้ำตาลดี-ไรโบส (D-ribose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล (glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

**3.3 การศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์**

**3.3.1 การเตรียมเซลล์แห้ง**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ โดยนำน้ำหนักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 5 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เก็บรักษาเซลล์แห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

**3.3.2 การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่ผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)**

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 10 กรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล (6N HCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้เย็น กรองแล้วนำส่วนใสที่ได้ไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ (evaporator) ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้และสารละลายมาตรฐาน (2, 6 DAP คือ *meso* DAP และ*LL*-DAP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose ขนาด 10x10 ไมโครเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของเมทานอล : น้ำ : กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอมอล : ไพริดีน (methanol : water : 6N HCl : pyridine) อัตราส่วน 80 : 26 : 4 : 10 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้ง ดีเวลอป (develop) ซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.4 (0.4% ninhydrin solution) ในสารละลายบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (water-saturated n-butanol) รอให้แห้ง นำไปอบที่ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับแถบมาตรฐานไดอะมิโนพิเมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ

**3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar)**

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N $H_2SO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเติมสารละลายอิ่มตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH)_2$) ลงไปจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้มาเติมเอทานอล (ethanol) 1 ถึง 2 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง แล้วระเหยให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไปจุดลงบนแผ่น HPLC cellulose (Merck, no.5716) ขนาด 10x10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของบิวทานอล : น้ำกลั่น : ไพริดีน : โทลูอีน (n-butanol : water : toluene : pyridine ) อัตราส่วน 10 : 6 : 6 : 1 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร ) รอให้แห้ง ดีเวลอพ (develop) ซ้ำอีกครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลายแอนนิลีน พทาเลท (aniline phthalate) (ภาคผนวก ข) รอให้แห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบจุดที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน บริเวณที่ปรากฏแถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี 2 แบบ คือ น้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 5 อะตอม จะให้แถบสีชมพู ได้แก่ น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส ส่วนน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 6 อะตอม จะให้แถบสีเหลือง ได้แก่ น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกาแลกโตส (Komagata และ Suzuki. 1987)

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแรมโนส กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลไรโบส

**3.3.4 การวิเคราะห์ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipids)**

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 150 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของเมทานอล (methanol) : น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.3 (0.3% NaCl) อัตราส่วน 100 : 10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมปิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม (chloroform) : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 90 : 100 :30 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 50 :100 : 40 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปรวมในหลอดทดลองใหม่ข้างต้น ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และน้ำปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วนำสารสกัดส่วนล่างไปเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น silica TLC (Merck 60 $F_{254}$, 10x10 cm) ทำจำนวน 4 แผ่น นำแผ่น TLC ที่ได้มาทำการดีเวลอพ (develop) 2 ทิศทาง (two-dimensionaldevelopment) ในระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยจุ่มแผ่น TLC ลงในตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 65 : 25 : 4 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้ง จากนั้นจุ่มแผ่น TLC แผ่นเดิมลงในตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก (acetic acid) : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40 : 7.5 : 6 : 2 โดยกลับด้าน TLC ในทิศทางที่ตั้งฉากกับแนวเดิม ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้งแล้วนำไปฉีดพ่นด้วยรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ (Minnikin และคณะ. 1984) ดังนี้

(1) ฉีดพ่นด้วย Dittmer & Lester reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)

(2) ฉีดพ่นด้วย Ninhydrin reagent (ภาคผนวก ข) รอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine,PE) เมทิล-ฟอสฟาทิดิลเอทาโนลามีน (methyl-phosphatidylethanolamine, methyl-PE) และไฮดรอกซิลฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (OH- phosphatidylethanolamine, OH-PE) (จุดสีชมพู)

(3) ฉีดพ่นด้วย Anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ข) รอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิด (จุดสีเขียวอมเหลือง) และลิปิดอื่นๆ (จุดสีน้ำเงิน)

(4) ฉีดพ่นด้วย Dragendorff reagent (ภาคผนวก ข) แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine, PC) (จุดสีส้ม)

(5) ฉีดพ่นด้วย Phosphomolybdic acid (ภาคผนวก ข) ใช้ตรวจไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipids) ทั้งหมดในเซลล์ ถ้าสารบนแผ่น TLC ใดเป็นไขมันชนิดมีขั้ว จะเกิดจุดสีดำบนพื้นหลังสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.5 การวิเคราะห์ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ (acyl type)**

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปตั้งไว้บนเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (heating block) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บรรจุคอลัมน์ (column) ด้วย Dowex ($CH_3COO^-$) (ภาคผนวก ข) ให้มีความสูง 5 เซนติเมตร โดยใช้พาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) เป็นคอลัมน์ นำสารละลายที่ได้จากการย่อยใส่ลงในคอลัมน์ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 400 ไมโครลิตร ชะสารละลายที่ได้จากการย่อยซึ่งติดอยู่ที่ก้นหลอดเติมลงในคอลัมน์ รอจนแห้ง ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยกรดไฮโดรคลอลิก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งกรดไกลโคลิก (glycolic acid) จะถูกชะออกมาในส่วน (fraction) สุดท้าย ตรวจสอบผลโดยดูดสารละลายในส่วนสุดท้ายนี้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายดอน รีเอเจนต์ (DON reagent) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันหากสารละลายที่ทดสอบมีกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ในผนังเซลล์ สารละลายที่ทำการทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (Komagata และ Suzuki. 1987)

## 3.4 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype)

**3.4.1 การแยกดีเอ็นเอ**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยนำน้ำหนักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) 1 ครั้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอออล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24: 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือ เป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate) ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้ง แล้วนำไปละลายในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร (Yukphan. 2006)

**3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)**

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตรดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (thermal cycler) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ตั้งเอาไว้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงในตารางที่ 3.2 (Yukphan และคณะ. 2005)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

| | ความเข้มข้น | ปริมาตร |
|---|---|---|
| primer : 20F* | 10 pmol/µl | 4.0 µl |
| primer : 1500R* | 10 pmol/µl | 4.0 µl |
| dNTP | 2.0 mM | 10.0 µl |
| 10X Taq buffer | 10X | 10.0 µl |
| $MgCl_2$ | 25.0 mM | 8.0 µl. |
| Taq DNA Polymerase | 5 Unit/µl | 0.5 µl |
| Milli Q water | - | 59.5 µl |
| Template DNA | 100-200 ng/µl | 4.0 µl |
| รวม | | 100.0 |

*primer : 20F (5' GAG TTT GAT CCT GC TCA G 3')

*primer : 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3')

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)

| อุณหภูมิ | เวลา | จำนวนรอบ (cycle) | ขั้นตอน |
|---|---|---|---|
| 94 องศาเซลเซียส | 3 นาที | 1 | denaturation step |
| 94 องศาเซลเซียส | 1 นาที | 25 | |
| 50 องศาเซลเซียส | 1 นาที | | annealing step |
| 72 องศาเซลเซียส | 2 นาที | | extension step |
| 72 องศาเซลเซียส | 3 นาที | 1 | |
| รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.4.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ให้มีความบริสุทธิ์**

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ของบริษัท Geneaid ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PB solution ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์อันใหม่ เติม EB buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

**3.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene (DNA sequencing)**

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ bigdye terminator cycle sequencing ready reation kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.4 (Yukphan และคณะ. 2005)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

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

*Primer 27F : AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T

520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG

1492R : TAC CAG GGT ATC TAA TCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม Big dye

| อุณหภูมิ | เวลา | จำนวนรอบ (cycle) |
|---|---|---|
| 96 องศาเซลเซียส | 3 วินาที | 1 |
| 96 องศาเซลเซียส | 10 วินาที | 25 |
| 50 องศาเซลเซียส | 5 วินาที | |
| 60 องศาเซลเซียส | 4 วินาที | 1 |

**3.4.5 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)**

ทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA version 6 (www.megasoftware.net/ (Yukphanละคณะ 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

## การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *45 PCWR-4-6 DH51B-4-3 และPN51b-9-4 มาศึกษาอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ จากผลการศึกษาสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces Amycolatopsis Actinomadura* และ *Micromonospora* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. สกุล *Streptomyces*

ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต คือ *45

เชื้อไอโซเลต *45

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต *45 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเส้นตรง สร้างเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Light Greenish Gray) สร้างเส้นใยอากาศงบนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar, ISP2) (รูปที่ 4.1 ก ข และค ) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีขาวอมเหลือง (Yellowish White) บนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar, ISP2) เจริญได้ดีบนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar, ISP2) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salt–starch agar, ISP4) อาหารเปปโตน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์ (peptone-yeast extract iron agar, ISP6) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) Glucose asparagine agar และ Nutrient agar (ภาคผนวก ก ) สามารถเจริญได้บนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ ที่มีเกลือความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 4 และเจริญได้บนอาหารซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4-10 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 และ50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง โปรตีนในนม แต่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-อะราบิโนส (D-arabinose) และน้ำตาลแลกโตส (Lactose) (ตารางที่ 4.2) สามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้ทุกชนิด (ตารางที่ 4.3)

ลักษณะทางเคโมไทป์

ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *LL* (ตารางที่ 4.4) ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์เป็น acetyl พบน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) ไรโบส (Ribose) แมนโนส (Mannose) และกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) (ตารางที่ 4.5) มีรูปแบบของฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2 (Phospholipid Type II) โดยพบ Phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylinositol (PI)

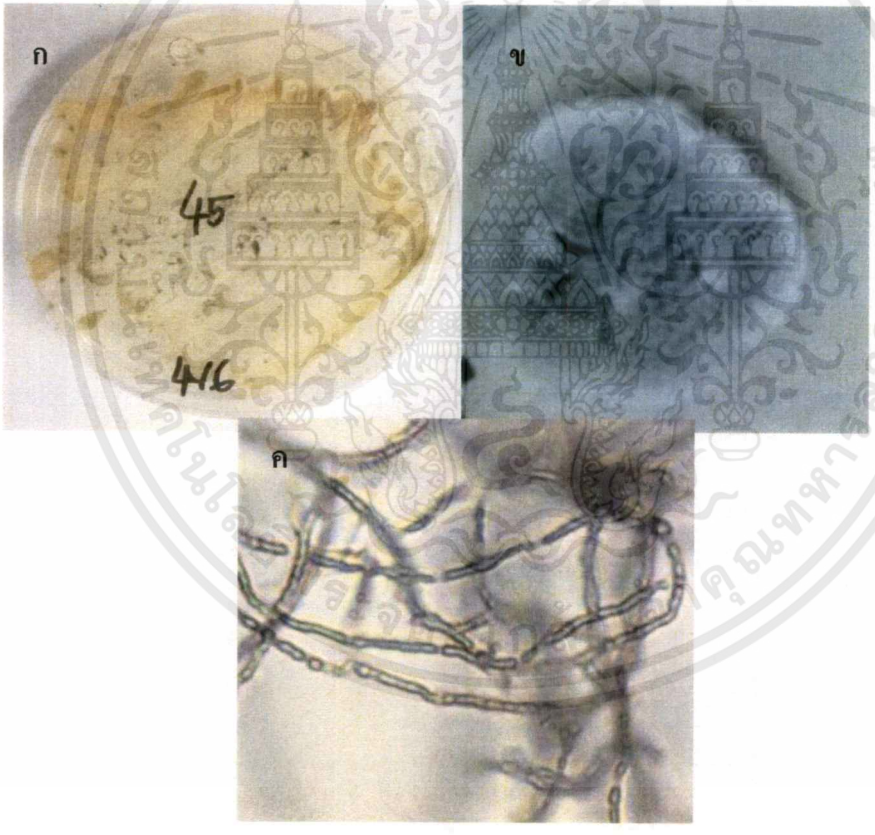
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phophatidylethanolamine (PE), phophatidylmonomethylethanolamine (PME), hydroxyl-phophatidylethanolamine (OH-PE) และunknown glycolipid (GL) ดังตารางที่ 4.6

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต *45 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces panaciradicis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similality) เท่ากับ 99.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 100 (รูปที่ 4.2)

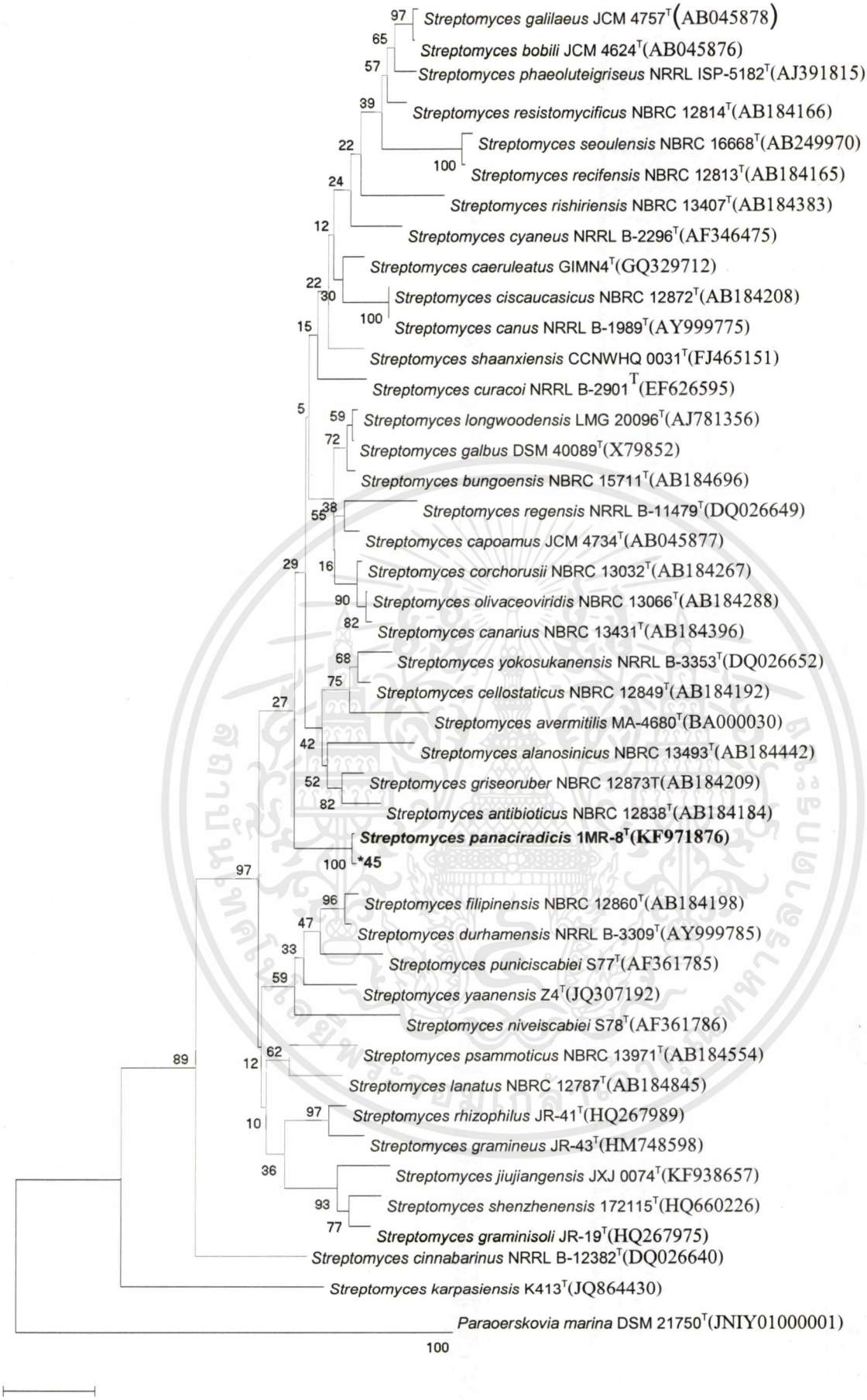
**จากลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต *45 นี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces***




รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต *45

(ก) และ (ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต *45 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สกุล *Amycolatopsis*

ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต คือ DH51B-4-3

เชื้อไอโซเลต DH51B-4-3

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เป็นสายตรง และแตกแขนงสร้างเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Light Greenish Gray) สร้างเส้นใยอากาศบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) (รูปที่ 4.3) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีขาวอมเหลือง (Yellowish White) บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) เจริญได้ดีบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) (ภาคผนวก ก) สามารถเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีเกลือความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ3 และเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5-9 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง โปรตีนในนม และเจลาตินได้ สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) และน้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) (ตารางที่ 4.2) สามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลดี-อะราบิโนส (D-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) (ตารางที่ 4.3)

ลักษณะทางเคโมไทป์

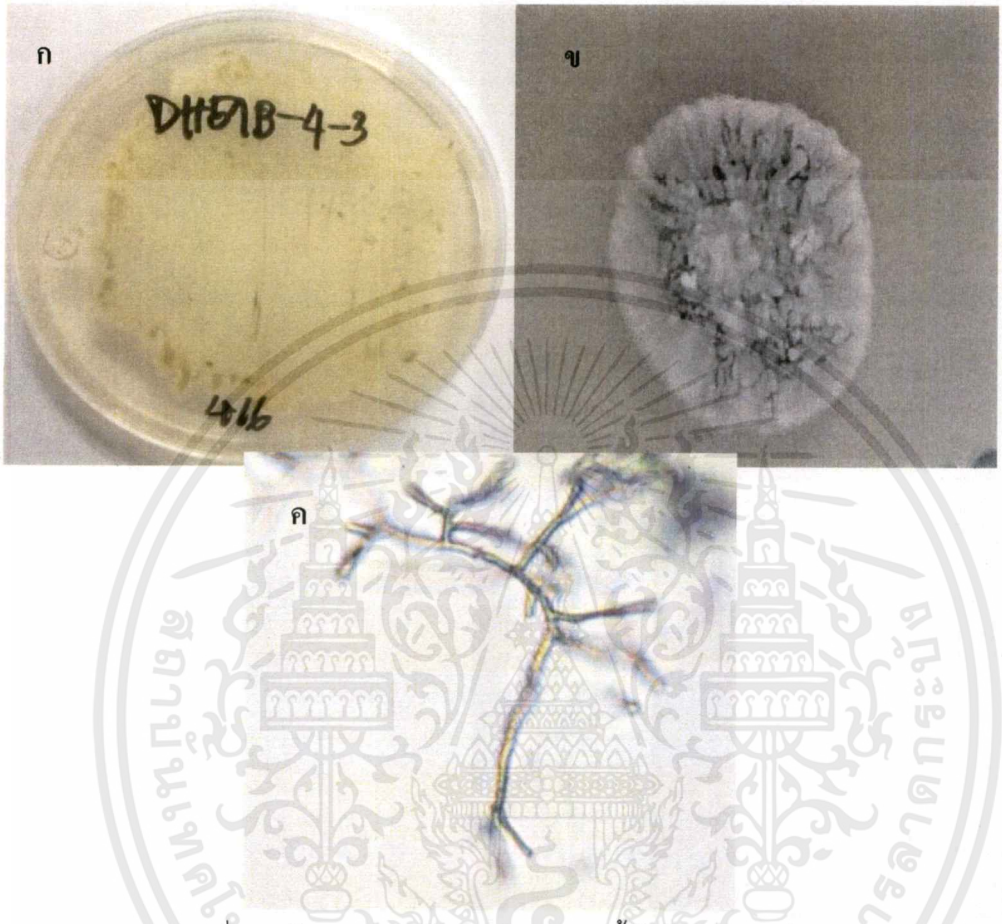
ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์เป็น acetyl พบน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) ไรโบส (Ribose) ไซโลส (Xylose) อะราบิโนส (D-arabinose) กาแลกโตส (D-galactose) และกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) (ตารางที่ 4.5) มีรูปแบบของฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2 (Phospholipid Type II) โดยพบ Phosphatidylglycerol (PG), phophatidylethanolamine (PE) และunknown glycolipid (GL) ดังตารางที่ 4.6

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต DH51B-4-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Amycolatopsis dongchuanensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similality) เท่ากับ 98.06 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 85 (รูปที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

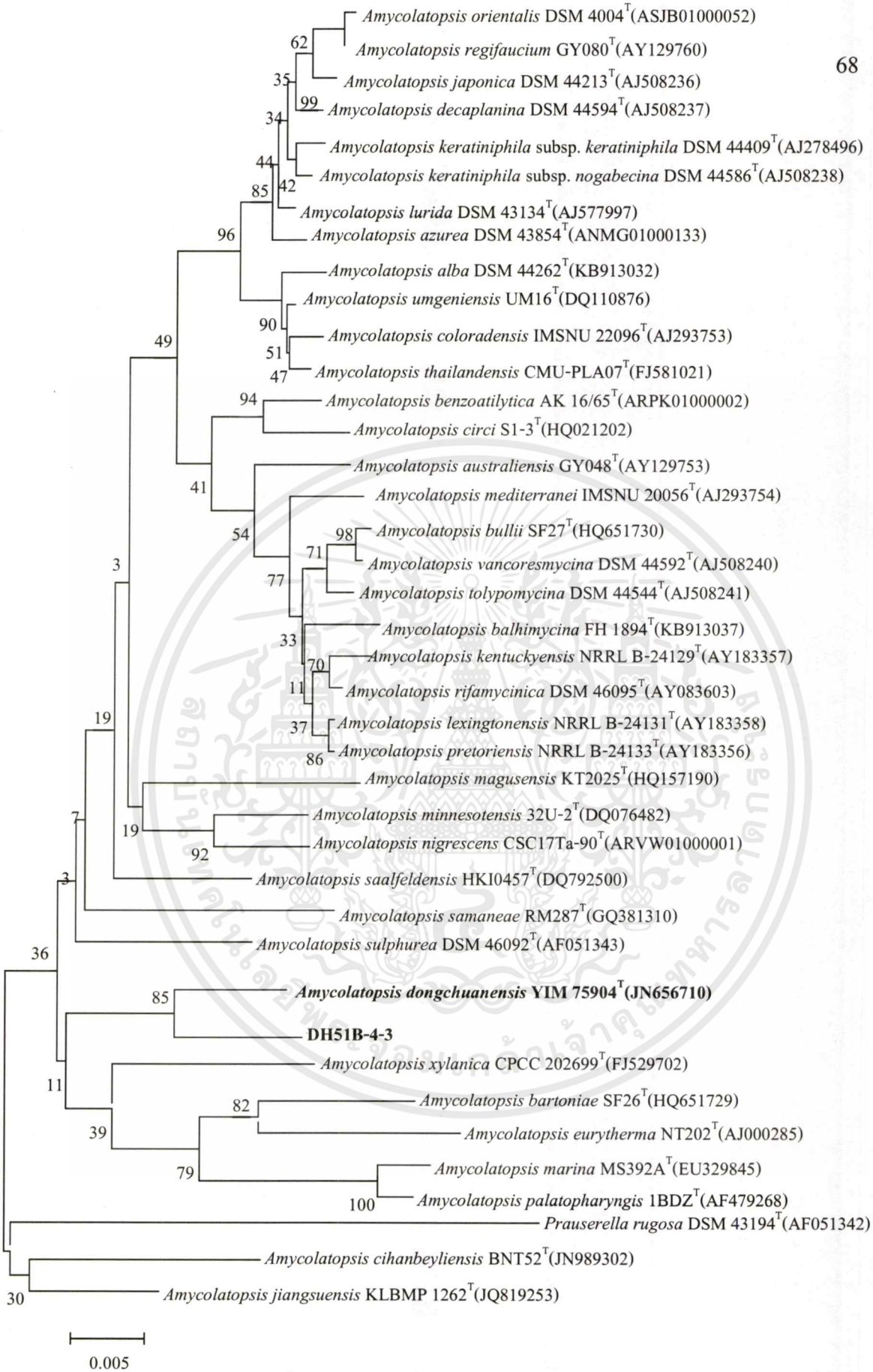
จากลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 นี้จัดอยู่ในสกุล *Amycolatopsis*




รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3

(ก) และ (ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 บน phylogenetic tree(neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สกุล *Actinomadura*

ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต คือ PCWR-4-6

เชื้อไอโซเลต PCWR-4-6

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ลักษณะกลมต่อกันเป็นรูปตะขอ สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียว (Pale Yellowish Green) สร้างเส้นใยอากาศบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) (รูปที่ 4.5) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีส้มอ่อน (Light Orange) บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2)เจริญได้ดีบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2)โอทมีล เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) อาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) และNutrient agar (ภาคผนวก ก) สามารถเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีเกลือความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 3 และเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5-8 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง โปรตีนในนม และเจลาตินได้ สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้บางชนิด ได้แก่ น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดีฟรัคโตส (D-fructose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) และกลีเซอรอล (Glycerol) (ตารางที่ 4.2) สามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-ไรโบส (D-ribose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) น้ำตาลแลกโตส (Lactose) น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-manitol ) (ตารางที่ 4.3)

ลักษณะทางเคโมไทป์

ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์เป็น acetyl พบน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) ไรโบส (Ribose) และกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (รูปแบบน้ำตาล ชนิด C) (ตารางที่ 4.5) มีรูปแบบของฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 1 (Phospholipid Type II) โดยพบPhosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol(PI) และunknown glycolipid (GL) ดังตารางที่ 4.6

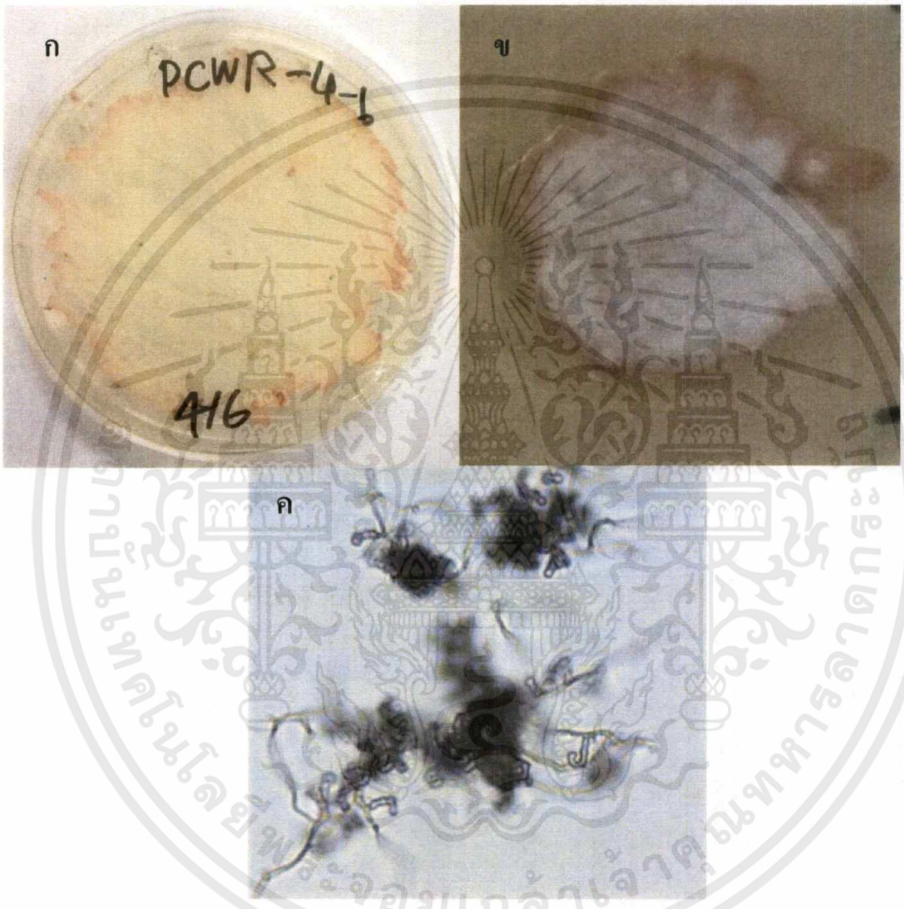
ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต PCWR-4-6 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura maheshkhaliensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similality) เท่ากับ 99.23 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 75 (รูปที่ 4.6) จากลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 นี้จัดอยู่ในสกุล *Actinomadura*

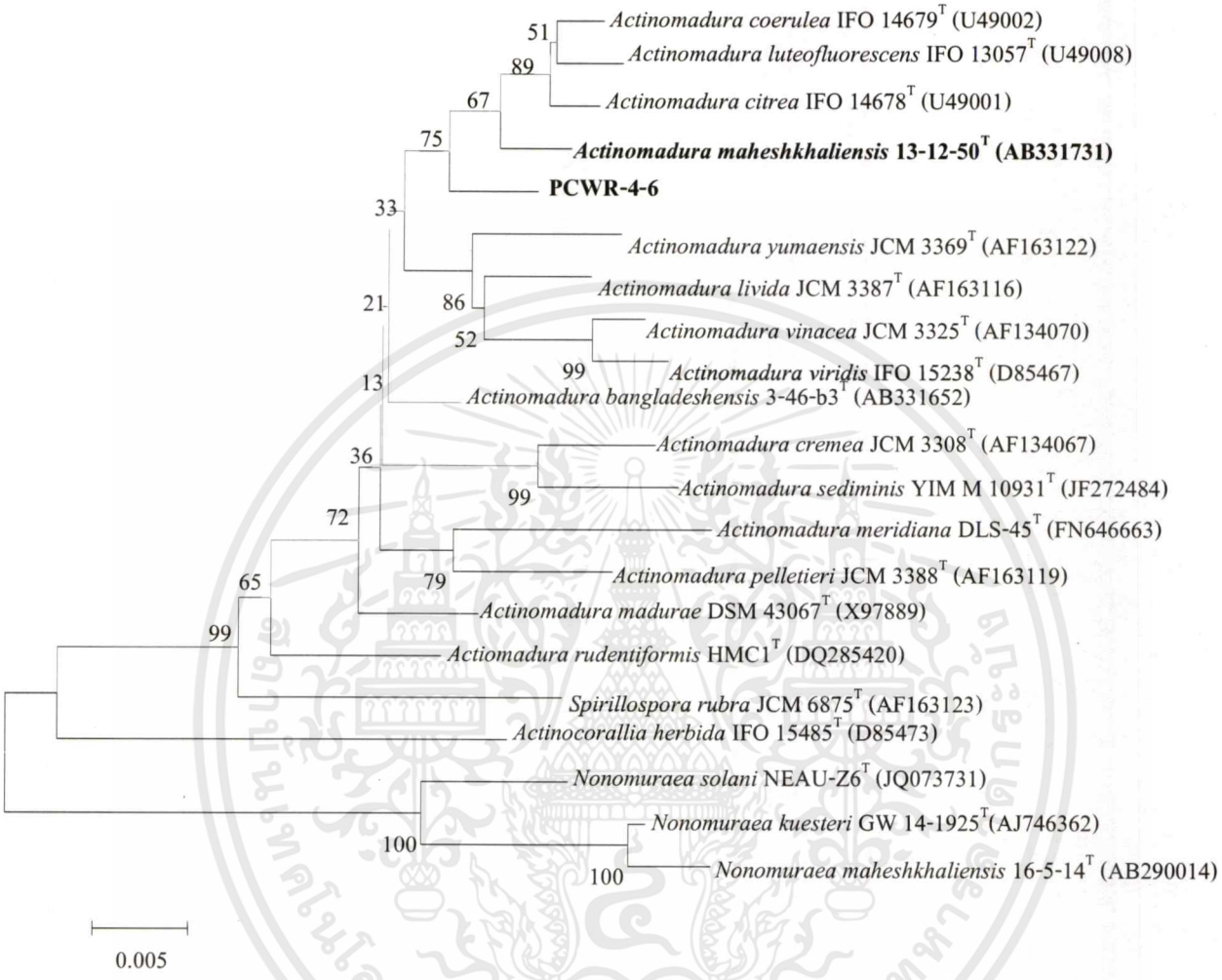
**จากลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 นี้จัดอยู่ในสกุล Amycolatopsis**




รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6

(ก) และ (ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 4.6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สกุล *Micromonospora*

ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต คือ PN51B-9-4

เชื้อไอโซเลต PN51B-9-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต PN51B-9-4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange Yellow) สร้างเส้นใยอากาศบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) (รูปที่ 4.7 ก ข และค) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีส้ม (Strong Orange Yellow) บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) เจริญได้ดีบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) และอาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์ (glycerol-asparagine agar, ISP5) (ภาคผนวก ก) สามารถเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีเกลือความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 3 และเจริญได้บนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5-9 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 และ50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้ง โปรตีนในนม และเจลาตินได้ สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-Xylose) กลีเซอรอล (Glycerol) และน้ำตาลแลกโตส (Lactose) (ตารางที่ 4.2) สามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น น้ำตาลดี-ไรโบส (D-ribose) น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-manitol) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) และกลีเซอรอล (Glycerol) (ตารางที่ 4.3)

ลักษณะทางเคโมไทป์

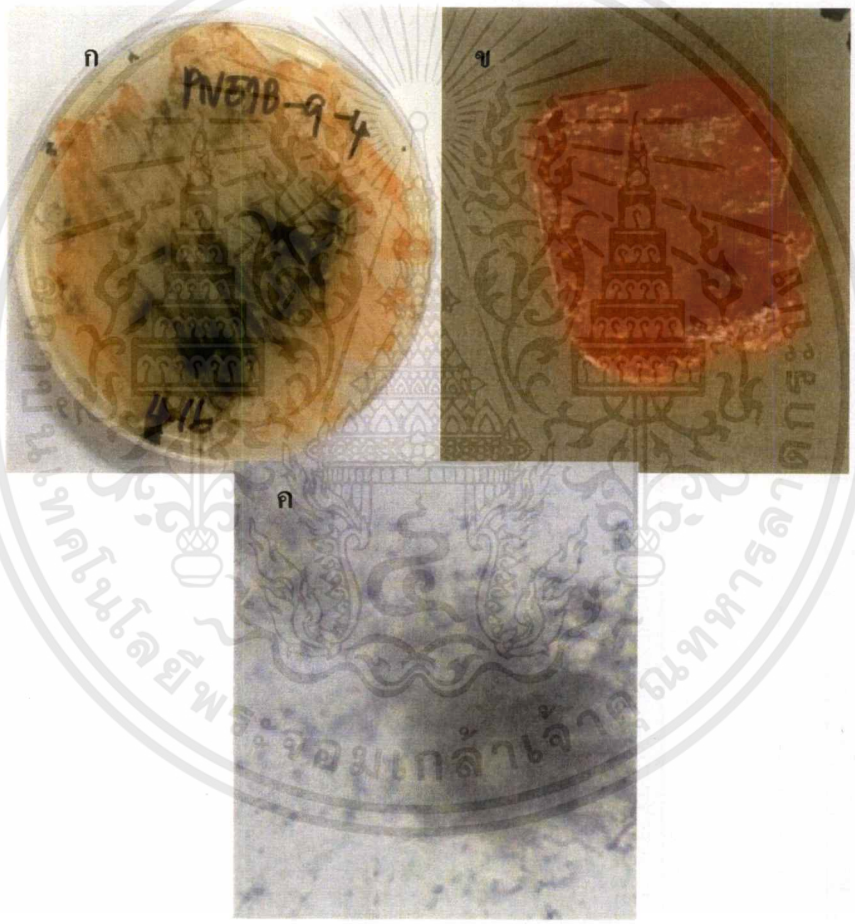
ผนังเซลล์ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์เป็น glycolyl พบไรโบส (Ribose) ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) อะราบิโนส (Arabinose) และกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (รูปแบบน้ำตาล ชนิด D) (ตารางที่ 4.5) มีรูปแบบของฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2 (Phospholipid Type II) โดยพบ Phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylinositol (PI) และphophatidylethanolamine (PE) ดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต PN51B-9-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora chaiyaphumensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similality) เท่ากับ 99.44 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 50 (รูปที่ 4.8)

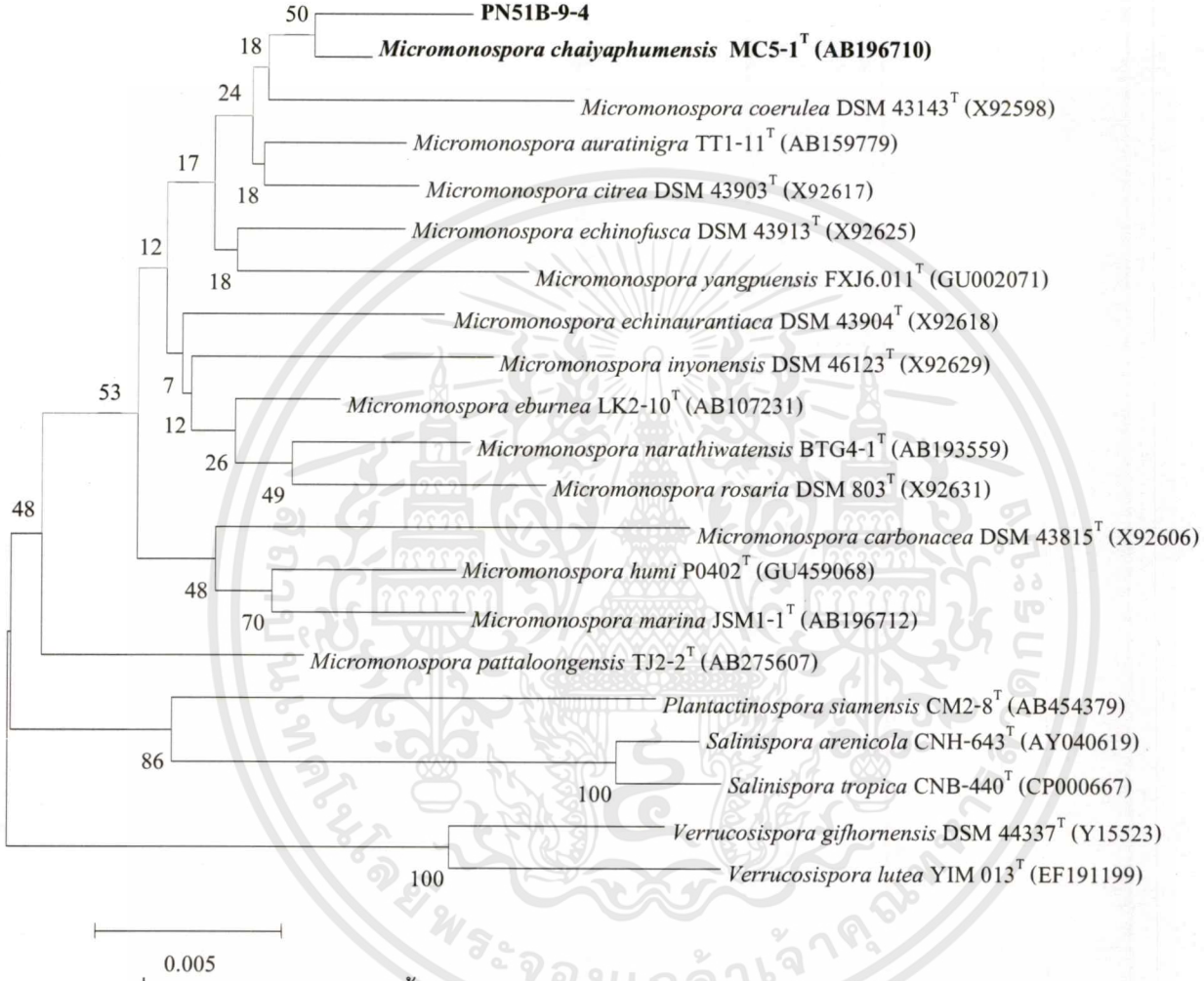
**จากลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4 นี้จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora***




รูปที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4

(ก) และ (ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance)
(กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4 บน phylogenetic tree(neighbor-joining method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท

| รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นเกลือ(ร้อยละ) | | | | | | | | ความเป็นกรด-ด่าง | | | | | | | | | อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส) | | | | | | Skim milk | | การย่อยแป้ง | การย่อยสลายเจลาติน | การรีดิวซ์ไนเตรต |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 1.5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 25 | 30 | 37 | 40 | 45 | 50 | Peptonization | Coagulation | | | |
| *45 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| PCWR-4-6 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | - | + | +++ | + |
| DH51B-4-3 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | ++ | + |
| PN51B-9-4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | ++ | + |

ตารางที่ 4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีท

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์บอน | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D-Melibiose | Salicin | D-Manitol | D-Sucrose | D-Xylose | D-Manose | D-Raffinose | Glycerol | D-Maltose | D-Rhamnose | Lactose | L-Arabinose | D-Cellobiose | D-Fructose | D-Galactose |
| *45 | ± | ± | ± | - | ± | ± | - | + | ± | ± | - | - | ± | ± | ± |
| PCWR-4-6 | ± | - | - | - | ± | - | - | ± | - | + | - | - | ± | ± | + |
| DH51B-4-3 | - | - | ± | ± | ± | ± | ± | + | ± | ± | ± | ± | ± | + | ± |
| PN51B-9-4 | ± | ± | ± | - | - | ± | - | - | ± | ± | - | ± | ± | - | ± |

ตารางที่ 4.3 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ( acid production from carbohydrates)

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์โบไฮเดรต | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D-glucose | D-ribose | D-xylose | D-galactose | D-cellobiose | D-salicin | D-arabinose | D-raffinose | D-fructose | L-rhamnose | D-sucrose | Lactose | Glycerol | D-manitol |
| *45 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PCWR-4-6 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | + | - | + | + |
| DH51B-4-3 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| PN51B-9-4 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | ± | - | - |

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาศึกษา

| สกุล | รหัสเชื้อ | ชนิดของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid type) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *LL*-DAP | *Meso*-DAP | *OH*-DAP |
| *Amycolatopsis* | DH51B-4-3 | - | + | - |
| *Streptomyces* | *45 | + | - | - |
| *Micromonospora* | PN51B-9-4 | - | + | - |
| *Actinomadura* | PCWR-4-6 | - | + | - |

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาศึกษา

| สกุล | รหัสเชื้อ | ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Rhamnose | Ribose | Xylose | Mannose | Arabinose | Glucose | Galactose |
| *Amycolatopsis* | DH51B-4-3 | Small amount | + | Small amount | - | + | + | + |
| *Streptomyces* | *45 | + | + | - | + | - | + | - |
| *Micromonospora* | PN51B-9-4 | - | + | + | + | + | + | - |
| *Actinomadura* | PCWR-4-6 | Small amount | + | - | - | - | + | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงองค์ประกอบของไขมันชนิดมีขั้วของเชื้อแอคติโนมัยสีท

| สกุล | รหัสเชื้อ | ชนิดของโพลาลิปิด (polar lipid type) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DPG | PG | PIMs | PI | PE | PME | OH-PE | Lyso-PE | PS | PC | GluNu |
| *Amycolatopsis* | DH51B-4-3 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| *Streptomyces* | *45 | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| *Micromonospora* | PN51B-9-4 | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| *Actinomadura* | PCWR-4-6 | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |

หมายเหตุ

PG คือ phosphatidylglycerol

DPG คือ diphosphatidylglycerol

PI คือ phosphatidylinositol

PIMs คือ phosphatidylinositol mannosides

PE คือ phophatidylethanolamine

PME คือ phophatidylmonomethylethanolamine

OH-PE คือ hydroxyl-phophatidylethanolamine

Lyso-PE คือ lysophophatidylethanolamine

PC คือ phophatidylcholine

GluNU คือ glucosamine containing phospholipids

PL คือ unknown phospholipid

PGL คือ unknown phosphoglycolipid

GL คือ unknown glycolipid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**อภิปรายผลการทดลอง**

จิราพร และคณะ (2554) ได้ศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลต ได้แก่ KL-A-5-2 KL-B-2-11 และKL-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 และลักษณะทางจีโนไทป์ซึ่งวิเคราะห์ลำดับของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA gene บางส่วน สามารถจำแนกเชื้อออกเป็น 4 สกุล คือ *Streptomyces Actinomadura Micromonospora* และ*Nocardia* น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีการเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) และเอการดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 8 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 61.54) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST20654 และ*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทางด้านเภสัชกรรมได้ในอนาคต

วิจิตรา (2545) ทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีท 100 ไอโซเลตที่แยกจากดิน 35 ตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งของเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อที่แยกได้ 80 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยสีท และอีก 20 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลไมโครโมโนสปอร่า การคัดเลือกขั้นต้นพบว่าสเตรปโตมัยซีส 55 ไอโซเลต และไมโครโมโนปอร่า 14 ไอโซเลต สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้โดยส่วนใหญ่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633 และ*Candida albicans* ATCC10231 ได้ดี และมีบางไอโซเลตสามารถสร้างสารต้านเชื้อ *Escherichia coli* ATCC25922 และ*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ได้ การคัดเลือกขั้นที่สองพบว่าสายพันธุ์ PC4-3 ที่ให้ผลดีในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพถูกคัดเลือกเพื่อการหมักสารทุติยภูมิสายพันธุ์นี้มี *L*-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และสายวิวัฒนาการพบว่ามีความใกล้เคียงกับสเตรปโตมัยสีทสายพันธุ์NRRL B-1865 สิ่งสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากน้ำหมักของสายพันธุ์นี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ATCC25923, *B.subtilis* ATCC6633 และ *C.albicans* ATCC10231 ได้ เมื่อทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีพร้อมการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแยกได้สารในกลุ่ม ansamycins ที่เคยพบแล้ว 2 ชนิดคือ geldanamycin และ17-O-demethylgeldanamycin การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล UV, IR, MS และNMR spectroscopy ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานว่าสาร geldanamycin แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ATCC25923 *และC.albicans* ATCC10231

กรรณิการ์ (2009) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินรอบรากข้าวและรากพืชได้แอคติโนมัยสีททั้งหมด จำนวน 210 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกออกตามกลุ่มสีของสปอร์สามารถจัดได้เป็น 7 กลุ่มสี ตามลักษณะสีสปอร์ โดยกลุ่มสปอร์สีเทามีสมาชิกจำนวนมากที่สุด (62 เปอร์เซ็นต์) จากการวิเคราะห์ ชนิดของ diaminopimalic acid ในเซลล์ที่ผ่านการย่อยพบว่า 163 ไอโซเลตพบ *LL*-diaminopimelic acid และ47 ไอโซเลทพบ *meso*-diaminopimelic acid ซึ่งจัดจำแนกไอโซเลตที่คัดแยกได้เป็นกลุ่ม *streptomycete* และnon-*streptomycete* ตามลำดับ เมื่อนำตัวแทนกลุ่มของไอโซเลตที่เป็น nonstreptomycete มาระบุชนิดด้วยการศึกษายีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลตเหล่านี้จัดอยู่ในจีนัส *Actinomadura, Actinopolymorpha, Amycolatopsis, Microbispora, Micromonospora, Nocardia, Nonomuraea* และ *Sphaerisporangium* เมื่อทดสอบความสามารถของไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด ในการยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TB003 ด้วยวิธี overlay method และทดสอบการ ยับยั้ง *Fusarium proliferatum* DOAC0842, *Helminthosporium oryzae* DOAC1570 และ *Rhizocthonia solani* DOAC1406 ด้วยวิธี dual culture plate assays พบว่า 141 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae*และมีจำนวน 122, 88 และ 78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Fusarium proliferatum, Helminthosporium oryzae* และ *Rhizocthonia solani* ได้ ตามลำดับ ทั้งนี้มี 41 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด และไอโซเลต K8S3 ซึ่งจากการศึกษายีน 16S rRNA พบว่าเหมือนกับ *Streptomyces hygroscopicus* เป็นไอโซเลตที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และเป็นไอโซเลตที่มีผลส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาใช้ต่อไป

จิตติ (2010) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 121 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินบริเวณภูเขาทางภาคตะวันตก และดินป่าชายเลนในจำนวนเชื้อทั้งหมดนั้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 57 ไอโซเลตที่มีกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso* เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งเชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น 12 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นเป็นสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Agromyces, Dactylosporangium, Micromonospora, Microbispora และPlanotetraspora* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต TJ2-2 และCM9-9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปของเชื้อสกุล *Micromonospora* และ*Agromyces* ตามลำดับ แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* และ *Agromyces* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต TJ2-2 และCM9-9 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Micromonospora* และ*Agromyces* โดยให้ชื่อว่า *Micromonospora pattaloongensis* และ *Agromyces tropica* นอกจากนี้น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 40.3 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้ สามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทในบริเวณป่าชายเลน และดินภูเขาทางภาคตะวันตกของประเทศไทยมีค่อนข้างสูง และควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อไป

จากผลการทดลองของเรานั้น พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยเบื้องต้น ซึ่งการวิจัยนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต *45 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Streptomyces panaciradicis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.93% ไอโซเลต PCWR-4-6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Actinomadura maheshkhaliesis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.23% ไอโซเลต DH51B-4-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Amicrolatopsis dongchuanensis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 98.06% ไอโซเลต PN51B-9-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Micromonospora chaiyaphumensis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.44% และมีเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 DH51B-4-3 และPN51B-9-4 ที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *45 PCWR-4-6 DH51B-4-3 และPN51B-9-4 โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถจำแนกได้เป็น 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces Actinomadura Amicrolatopsis* และ *Micromonospora* พบว่าเชื้อไอโซเลต *45 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Streptomyces panaciradicis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.93% ไอโซเลต PCWR-4-6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Actinomadura maheshkhaliesis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.23% ไอโซเลต DH51B-4-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Amicrolatopsis dongchuanensis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 98.06% ไอโซเลต PN51B-9-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Micromonospora chaiyaphumensis* มากที่สุดด้วย %similarity เท่ากับ 99.44% ดังนั้น เชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 DH51B-4-3 และPN51B-9-4 จึงมีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้เก็บรวบรวมข้อมูลอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยด้านจุลชีววิทยา การเกษตร ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ และอาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


กรรณิการ์ ดวงมาลย์. 2552. การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทกลุ่มปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.tnrr.in.th/2557/?page=result_search&record_id=2329

เกศแก้วกัลยา และคณะ. 2555. “การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เกษม และคณะ. 2552. “การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตติ ท่าไว. 2553. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินภูเขาทางภาคตะวันตกและดินป่าชายเลน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.tnrr.in.th/2557/?page=result_search&record_id=4097

จิตติ ท่าไว. 2547. อนุกรมวิธานของเชื้อสายพันธุ์ไมโครโมโนสปอราจากดินป่าพรุของประเทศไทยและสารทุติยภูมิของเชื้อไอโซเลตที่คัดเลือก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.thaithesis.org/detail.php?id=1082547600244

จิราพร และคณะ. 2554. “การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีท ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินของประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑามาศ และคณะ. 2554. “อนุกรมวิธานและองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อไมโครโมโนสปอรา พีเอส 3-1.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชนินทร์ และคณะ. 2546. “เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง.” ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41**. กรุงเทพฯ : สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดุษฎี และคณะ. 2555. เชื้อแอคติโนมัยสีทบนพื้นผิวที่แยกจากต้นข้าว และกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อนั้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิภาวัลย์ และคณะ. 2556. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิดโพลีคาโพรแลคโตน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา. 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซีทส์จากดินบริเวณเกาะเสม็ด. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaithesis.org/detail.php?id=1082545001289

Aroi, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. Tokyo : The Seciety for Actinomycetes Japan.

El-Shatoury, S., Mitchell, J., Bahgat, M. and Dewedar, A. 2064. "**Biodirersity of Actinomycetes in a constructed wetland for industrial effluent treatment.**" Actinomycetological. **18 : 1-7.**

Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. 1989. "**Fluorometric deoxyribonucleic acid deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybriddization in which radioisotopes are used to determine genetic ralatedness among bacterial strains.**" Internationnal Journal of Systematic Bacteriology. **39 : 224-229.**

Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handerhan, J.E. and Pang, C.H. 1974. "***Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain.**" Internationnal Journal of Systematic Bacteriology. **24 : 54-63.**

Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K. and Shibai, H. 2005. "**Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil extract agar medium.**" Journal of Bioscience and Bioengineering. **99 : 485-495.**

Kelly, K.L. 1964 Inter Society Color Council-National Bureau of Standard **Color** Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington, DC : US Government Printing office.

Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. "**Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics.**" Methods in microbiology. **19 : 161-207.**

Lechevalier, M.P., stern, A.E. and Lechevalier, H.A. 1981. "**Phospholipids in the taxonomy of Actinomycetes.**" Journal of Zentbl Bakteriol Hyg Abt 1 Suppl. **11:111 116.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G, Athalye, M., schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. "**An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids.**" Journal of Microbiological Methods. **2:233 -241.**

Shirling. E.B. and Gotttlieb, D. 1996. "**Methods for characterization of *Streptomyces* species.**" International Journal of Systematic Bacteriology. **16:313-340**

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**

Vobis, G. 1997. "Morphology of Actinomycetes." 180-191. In Miyadoh, S. **Atlas of Actinomycetes**. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.

Yukphan, P., Malimas, T. Polacharoen, W. Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.2005. "***Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov. a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the ∝-*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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
## อาหารเลี้ยงเชื้อ

**Arginin-Vitamin (AV) agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 1.0 | กรัม |
| Glycerol | 1.0 | กรัม |
| L-arginine | 0.3 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.3 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| NaCl | 0.3 | กรัม |
| Trace elements mixture 1 | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Agar | 18.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |
| pH 6.4 | | |
| นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที | | |
| Vitamins mix A1 | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH) | 0.025 | กรัม |
| Cyclohexamide (ละลายใน 95% EtOH) | 0.050 | กรัม |
| Terbinafin (ละลายใน MtOH) | 0.001 | กรัม |

**Humic acid-Vitamin agar (สูตรดัดแปลง) ที่เติมสารปฏิชีวนะ**

| | | |
|---|---|---|
| Humic acid (ละลายใน 0.2N NaOH 10 มิลลิลิตร) | 1.0 | กรัม |
| Yeast extract | 0.050 | กรัม |
| Casamino acid | 0.020 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 0.2 | กรัม |
| KCl | 1.7 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.050 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.010 | กรัม |
| Trace elements mix1 | 0.2 | มิลลิลิตร |
| Agar | 18.0 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |
| pH 7.0 | | |
| นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที | | |
| Vitamins mix A1 | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH) | 0.025 | กรัม |
| Cyclohexamide (ละลายใน 95% EtOH) | 0.050 | กรัม |
| Terbinafin (ละลายใน MtOH) | 0.001 | กรัม |

**Soil extract agar (สูตรดัดแปลง) ที่เติมสารปฏิชีวนะ**

| | | |
|---|---|---|
| $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $Ca(NO_3)2 \cdot 4H_2O$ | 0.25 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.05 | กรัม |
| $K_2SO_4$ | 0.03 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.02 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 0.1 | กรัม |
| Trace elements mix1 | 0.3 | มิลลิลิตร |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.02 | กรัม |
| Yeast extract | 0.1 | กรัม |
| Casamino acid | 0.1 | กรัม |
| Glucose | 0.2 | กรัม |
| Soil extract | 100 | กรัม |
| Agar | 18.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |
| pH 7.0 | | |
| นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที | | |
| Vitamins mix A1 | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH) | 0.025 | กรัม |
| Cyclohexamide (ละลายใน 95% EtOH) | 0.050 | กรัม |
| Terbinafin (ละลายใน MtOH) | 0.001 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soil extract agar (สูตรดัดแปลง)

| | | |
|---|---|---|
| $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $Ca(NO_3)2 \cdot 4H_2O$ | 0.25 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.05 | กรัม |
| $K_2SO_4$ | 0.03 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.02 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 0.1 | กรัม |
| Trace elements mix1 | 0.3 | มิลลิลิตร |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.02 | กรัม |
| Yeast extract | 0.1 | กรัม |
| Casamino acid | 0.1 | กรัม |
| Glucose | 0.2 | กรัม |
| Soil extract | 100 | กรัม |
| Agar | 18.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Soil extract**

| | | |
|---|---|---|
| Humic soil | 1 | กิโลกรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรองด้วยสำลี และทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (นำส่วนใสไปใช้)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

**Vitamins mix A1**

| | | |
|---|---|---|
| p-aminobenzoic acid | 0.05 | กรัม |
| Calcium pantothenate | 0.05 | กรัม |
| Inositol | 0.05 | กรัม |
| Niacin | 0.05 | กรัม |
| Pyridoxin HCl | 0.05 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| Ribofravin | 0.05 | กรัม |
| Thiamine HCl | 0.05 | กรัม |
| Biotin | 0.025 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

**Trace elements mix1**

| | | |
|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 4.0 | กรัม |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2.0 | กรัม |
| $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ | 0.1 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5.0 | กรัม |
| KI | 0.05 | กรัม |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 2.0 | กรัม |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.05 | กรัม |
| $H_2SO_4$ 95-97% p.a. | 1.0 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

**Glucose-yeast extract broth**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.0 | กรัม |
| Yeast extract | 10.0 | กรัม |

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Yeast extract-Malt extract agar (ISP2)**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 4.0 | กรัม |
| Yeast extract | 4.0 | กรัม |
| Malt extract | 10.0 | กรัม |
| Agar | 18.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Oatmeal agar (ISP3)**

| | | |
|---|---|---|
| Oatmeal | 20.0 | กรัม |
| Trace salts solution | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Agar | 20.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Inorganic salt-strach agar (ISP4)**

| | | |
|---|---|---|
| Solution strach | 10.0 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ (anhydrous) | 1.0 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.0 | กรัม |
| NaCl | 1.0 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2.0 | กรัม |
| $CaCO_3$ | 2.0 | กรัม |
| Trace salts solution | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Agar | 20.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Glycerol-asparagine agar (ISP5)**

| | | |
|---|---|---|
| L-asparagine (anhydrous) | 1.0 | กรัม |
| Glycerol | 10.0 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ (anhydrous) | 1.0 | กรัม |
| Trace salts solution | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Agar | 20.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Peptone-Yeast extract iron agar (ISP6)**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone iron agar | 36 | กรัม |
| Yeast extract | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Tyrosine agar (ISP7)**

| | | |
|---|---|---|
| Glycerol | 15.0 | กรัม |
| L-tyrosine | 0.5 | กรัม |
| L-asparagine | 1.0 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ (anhydrous) | 0.5 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| Trace salts solution | 1.0 | มิลลิลิตร |
| Agar | 20.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salt solution

| | | |
|---|---|---|
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 | กรัม |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0.1 | กรัม |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

**Carbon utilization agar (ISP9)**

| | | |
|---|---|---|
| Carbon sources | | |
| Carbohydrate | 10.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Pridham and Gottlieb trace salts**

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.64 | กรัม |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.11 | กรัม |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0.79 | กรัม |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

**Basal mineral salts agar**

| | | |
|---|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2.64 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ (anhydrous) | 2.38 | กรัม |
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 5.65 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.0 | กรัม |
| Pridham and Gottlieb trace salts | 1.0 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 900 | มิลลิลิตร |
| Agar | 15.0 | กรัม |

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ Carbon sources มาผสมกับ Basal mineral salts agar

**Glucose asparagine agar**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.0 | กรัม |
| Asparagine | 0.5 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ (anhydrous) | 0.5 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Czapek's sucrose agar (Difco)**

| | | |
|---|---|---|
| Sucrose | 30.0 | กรัม |
| $NaNO_3$ | 2.0 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 1.0 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| $MgSO_4$ | 0.5 | กรัม |
| KCl | 0.5 | กรัม |
| $FeSO_4$ | 0.01 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient agar (Difco)**

| | | |
|---|---|---|
| Beef Extract | 3.0 | กรัม |
| Peptone | 5.0 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Peptonization and Coagulation test medium**

| | | |
|---|---|---|
| Skim milk | 10.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**Peptonization test medium**

Solution A

| | | |
|---|---|---|
| Skim milk | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 50 | มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Solution B

| | | |
|---|---|---|
| Agar | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 50 | มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้สารละลายเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

จึงนำ Solution A มาผสมกับ Solution B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Boullion gelatin broth**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 1.0 | กรัม |
| Meat Extract | 0.5 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| Galatin | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Peptone $KNO_3$ broth**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 1 | กรัม |
| $KNO_3$ | 0.1 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Basal Inorganic Nitrogen medium**

| | | |
|---|---|---|
| Carbohydrate | 10.0 | กรัม |
| $(NH_4)2HPO_4$ | 1.0 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.0

| | | |
|---|---|---|
| 0.04% Bromocresoi purple | 15 | มิลลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**Tryptic Siol Agar (Difco)**

| | | |
|---|---|---|
| Pancreatic Digest of casein | 17.0 | กรัม |
| Emzymetic Digest of Soybean Meal | 3.0 | กรัม |
| NaCl | 5 | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 2.5 | กรัม |
| Dextrose | 2.5 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Sabouraud dextrose agar**

| | | |
|---|---|---|
| Special peptone | 10.0 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| Agar | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

pH 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

## สารเคมี

**Basic lauryl-sulfate solution**

| | | |
|---|---|---|
| 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 |
| Distilled water | 1 | ลิตร |

pH 6.8-7.0 (KOH/HCl)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**1.5% Phenol solution**

| | | |
|---|---|---|
| Phenol | 15 | มิลลิลิตร |
| Distilled water | 985 | ลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Sulphanilic acid solution**

| | | |
|---|---|---|
| Sulphanilic acid | 0.8 | กรัม |
| 5N Acetic acid | 100 | มิลลิลิตร |

ละลาย Sulphanilic acidใน5N Acetic acid โดยใช้ความร้อน

***N,N*-dimethyl-1-naphthylamine solution**

| | | |
|---|---|---|
| *N,N*-dimethyl-1-naphthylamine | 0.5 | กรัม |
| 5N Acetic acid | 100 | มิลลิลิตร |

ละลาย *N,N*-dimethyl-1-naphthylamine ใน5N Acetic acid โดยใช้ความร้อน

**Aniline phthalate**

| | | |
|---|---|---|
| Phthalic acid | 3.25 | กรัม |
| Water-saturated n-butanol | 100 | มิลลิลิตร |
| Aniline | 2 | มิลลิลิตร |

**สารที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ Polar lipids**

Dittmer & Lester reagent

Solution A

| | | |
|---|---|---|
| Molybdic anhydride (MoO3) | 4.011 | กรัม |
| 25N sulfuric acid | 100 | มิลลิลิตร |

ละลาย Molybdic anhydride ใน25N sulfuric acid โดยใช้ความร้อน

Solution B

| | | |
|---|---|---|
| Molybdic anhydride (MoO3) | 0.178 | กรัม |
| Solution A | 50 | มิลลิลิตร |

ละลาย Molybdic anhydride ใน Solution A โดยใช้ความร้อน และต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทส่วนที่ตกตะกอนทิ้ง

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ninhydrin reagent

| | | |
|---|---|---|
| Nihydrin | 0.4 | กรัม |
| Water-saturated n-butanol | 100 | มิลลิลิตร |

**Anisaldehyde regent**

| | | |
|---|---|---|
| Ethanol | 90 | มิลลิลิตร |
| Sulfuric acid | 5 | มิลลิลิตร |
| *p*-Anisaldehyde | 5 | มิลลิลิตร |
| Acetic acid | 1 | มิลลิลิตร |

**Dragendorff reagent**

| | | |
|---|---|---|
| Solution A | | |
| Basic bismuth nitrate | 1.7 | กรัม |
| Acetic acid | 80 | มิลลิลิตร |
| Solution B | | |
| KI | 40 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 10

มิลลิลิตร และ Acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)

**Reagent 1, Saponification reagent**

| | | |
|---|---|---|
| Sodium hydroxide | 15 | กรัม |
| Methanol (HPLC grade) | 50 | มิลลิลิตร |
| Mili-Q water | 50 | มิลลิลิตร |

ละลาย Sodium hydroxide ใน Mili-Q water ก่อนแล้วค่อยผสมกับ Methanol

**Reagent 2, Methylation reagent**

| | | |
|---|---|---|
| 6 N Hydrochloric acid | 65 | มิลลิลิตร |
| Methanol (HPLC grade) | 55 | มิลลิลิตร |

pH ต่ำกว่า 1.5

**Reagent 3, Extraction solvent**

| | | |
|---|---|---|
| n-Hexane (HPLC grade) | 50 | มิลลิลิตร |
| Methyl-tert-Butyl Ether (HPLC grade) | 50 | มิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Reagent 4, Base wash**

| | | |
|---|---|---|
| Sodium hydroxide | 1.2 | กรัม |
| Milli-Q water | 100 | มิลลิลิตร |

**Reagent 5, Saturated sodium chloride**

| | | |
|---|---|---|
| Sodium chloride | 40 | กรัม |
| Milli-Q water | 100 | มิลลิลิตร |

**การเตรียม Dowex ($CH_3COO^-$)**

1. แช่ Dowox 1 ใน 2 N NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7
2. แช่ Dowox 1 ใน 1 N $CH_3COOH$ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองแล้วล้าง

ด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7

**Don reagent**

| | | |
|---|---|---|
| 2,7-Dihydroxynapthalene | 10 | มิลลิกรัม |
| Sulfuric acid | 50 | มิลลิลิตร |

ละลาย 2,7-Dihydroxynapthalene ใน Sulfuric acid เข้มข้น จะได้สารละลายสีเหลือง

หุ้มภาชนะที่บรรจุด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ เก็บไว้ค้างคืนในที่มืด สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี

**TE buffer**

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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**1 M EDTA** (pH 8.0)

| | | |
|---|---|---|
| EDTA | 372.24 | มิลลิลิตร |

น้ำกลั่น

ผสม EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1 M Tris-Cl (pH 8.0)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris-base | 121.1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | | |

ผสม Tris-base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

**RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| RNase A | 100 | มิลลิกรัม |
| 0.15 M Nacl | 10 | มิลลิลิตร |

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที

เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| Proteinase K | 100 | มิลลิกรัม |
| 50 mM Tris-HCl | 10 | มิลลิลิตร |
| pH 7.5 | | |

**20xSSC**

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 175.3 | กรัม |
| Tri-sodium citrate·$2H_2O$ | 88.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | | |

ชั่ง NaCl และ Tri-sodium citrate·$2H_2O$ ใส่ในน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากัน

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 10 M NaoH

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**1xSSC**

| | | |
|---|---|---|
| 20xSSC | 5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 95 | มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**สารที่ใช้การทำ DNA-DNA Hybridization**

**10xPBSM**

| | | |
|---|---|---|
| $MgCl_2·7H_2O$ | 95 | มิลลิกรัม |
| 10xPBS | 10 | มิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Pre-hybridization solution**

| | | |
|---|---|---|
| 20xSSC | 1 | มิลลิลิตร |
| 50xDenhardt solution | 1 | มิลลิลิตร |
| Denaturated Salmon DNA (10 mg/ml) | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Formamide | 5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 2.9 | มิลลิลิตร |

**Hybridization solution**

| | | |
|---|---|---|
| น้ำกลั่น | 2.8 | มิลลิลิตร |
| Dextran sulfate | 0.25 | กรัม |
| 20xSSC | 1 | มิลลิลิตร |
| 50xDenhardt solution | 1 | มิลลิลิตร |
| Denaturated Salmon DNA (10 mg/ml) | 0.1 | มิลลิลิตร |
| Formamide | 5 | มิลลิลิตร |

**Solution I**

| | | |
|---|---|---|
| BSA | 0.25 | กรัม |
| Trition-X-100 | 50 | ไมโครลิตร |
| 1X PBS | 50 | มิลลิลิตร |

**Solution II**

| | | |
|---|---|---|
| Streptavidin POD | 1 | ไมโครลิตร |
| Solution I | 4 | มิลลิลิตร |

**Solution III**

| | | |
|---|---|---|
| TMB (10 mg/ml in DMFO) | 100 | ไมโครลิตร |
| 0.3% $H_2O_2$ | 100 | ไมโครลิตร |
| 0.1 M Citric acid in 10% DMFO + 0.2 M $Na_2HPO_4$ buffer pH 6.2 | 5 | มิลลิลิตร |

**100x denhardt solution**

| | | |
|---|---|---|
| Bovine serum albumin (fraction V) | 2 | กรัม |
| Polyvinylpyrolidone | 2 | กรัม |
| Ficoll 400 | 2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2xPBS**

| | | |
|---|---|---|
| 8 mM $Na_2HPO_4$ | 1.15 | กรัม |
| 1.5 mM $KH_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| 137 mM Nacl | 8.0 | กรัม |
| 2.7 mM KCl | 0.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 500 | มิลลิลิตร |

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

## วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

**1. ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 4-5**

สารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์ หรือ ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M citrate phosphate buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 19.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ($Na_2HPO_4$, $7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4$, $12H_2O$ 71.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตารางปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

| pH | 0.1 M citric acid | 0.2 M sodium phosphate (ml) |
|---|---|---|
| 2.6 | 44.6 | 5.4 |
| 3.0 | 39.8 | 10.2 |
| 3.4 | 35.9 | 14.1 |
| 3.8 | 32.3 | 17.7 |
| 4.2 | 29.4 | 20.6 |
| 4.6 | 26.7 | 23.3 |
| 5.0 | 24.32 | 25.7 |
| 5.4 | 22.2 | 27.8 |
| 5.8 | 19.7 | 30.3 |
| 6.2 | 16.9 | 33.1 |
| 6.6 | 13.6 | 36.4 |
| 7.0 | 6.5 | 43.6 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6-8**

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

| pH | A (มิลลิลิตร) | B (มิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| 5.8 | 4.00 | 46.00 |
| 6.0 | 6.15 | 43.85 |
| 6.2 | 9.25 | 40.75 |
| 6.4 | 13.25 | 36.75 |
| 6.6 | 18.75 | 31.25 |
| 6.8 | 24.50 | 25.50 |
| 7.0 | 30.50 | 19.50 |
| 7.2 | 36.00 | 14.00 |
| 7.4 | 40.50 | 9.50 |
| 7.6 | 43.50 | 6.50 |
| 7.8 | 45.75 | 4.25 |
| 8.0 | 47.35 | 2.65 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. $Na_2HPO_4$ - NaOH buffer pH 9-12**

การเตรียม $Na_2HPO_4$-NaOH buffer ตามวิธีการของ Bates and Ower (1956) อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และ สารละลาย B X มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M $Na_2HPO_4$ (7.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M NaOH (2.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

| pH | B (มิลลิลิตร) |
|---|---|
| 9.0 | 2.00 |
| 9.9 | 3.3 |
| 10.0 | 4.1 |
| 11.1 | 5.1 |
| 11.2 | 6.3 |
| 11.3 | 7.6 |
| 11.4 | 9.1 |
| 11.5 | 11.1 |
| 11.6 | 13.5 |
| 11.7 | 16.2 |
| 11.8 | 19.4 |
| 11.9 | 23.0 |
| 12.0 | 26.9 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ง

## ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* บนอาหารต่างๆ

| รหัส | อาหาร | การเจริญ | สีของเส้นใยอาหาร | สีของเส้นใยอากาศ | สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ |
|---|---|---|---|---|---|
| *45 | ISP2 | ดี | Light Greenish Gray | Bluish White | Yellowish white |
| | ISP3 | ปานกลาง | Pale Violet | Pale Violet | Light Purplish Gray |
| | ISP4 | ดี | Yellowish white | Pale Purple | Light Greenish Gray |
| | ISP5 | ปานกลาง | Light Greenish Gray | Greenish White | Greenish White |
| | ISP6 | ดี | Strong Greenish Yellow | Brilliant Geenish Yellow | Vivid Geenish Yellow |
| | ISP7 | ดี | Dark Grayish Yellow | Light Grayish Brown | Dark Grayish Yellow |
| | Glu.A : | ดี | Light Greenish Gray | - | Light Greenish Gray |
| | N.A. | ดี | Yellowwish Gray | - | Yellowwish Gray |

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Actinomadura* บนอาหารต่างๆ

| รหัส | อาหาร | การเจริญ | สีของเส้นใยอาหาร | สีของเส้นใยอากาศ | สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ |
|---|---|---|---|---|---|
| PCWR-4-6 | ISP2 | ดี | Pale Yellowish Green | Light Orange | Light Orange |
| | ISP3 | ดี | Vivid Orange Yellow | Light Greenish Gray | Yellowish wthie |
| | ISP4 | ปานกลาง | Bluish white | Light Greenish Gray | Light Greenish Gray |
| | ISP5 | ปานกลาง | Greenish White | Greenish White | Greenish White |
| | ISP6 | ปานกลาง | Strong Greenish Yellow | Yellowish wthie | Brilliant Geenish Yellow |
| | ISP7 | ดี | Brilliant Geenish Yellow | Light Geenish Gray | Light Greenish Gray |
| | Glu.A : | ปานกลาง | Light Greenish Gray | - | Light Greenish Gray |
| | N.A. | ดี | Strong Orange Yellow | Vivid Orange Yellow | Vivid Orange Yellow |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Amycolatopsis* บนอาหารต่างๆ

| รหัส | อาหาร | การเจริญ | สีของเส้นใยอาหาร | สีของเส้นใยอากาศ | สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ |
|---|---|---|---|---|---|
| DH51B-4-3 | ISP2 | ดี | Light Greenish Gray | Very Light Blue | Yellowish wthie |
| | ISP3 | ปานกลาง | Light Greenish Gray | Light Greenish Gray | Light Purplish Gray |
| | ISP4 | ปานกลาง | Pale Blue | Pale Blue | Light Greenish Gray |
| | ISP5 | ปานกลาง | Yellowish wthie | Yellowish wthie | Yellowish wthie |
| | ISP6 | ปานกลาง | Moderate Orange Yellow | Brilliant Orange Yellow | Vivid Orange Yellow |
| | ISP7 | ดี | Moderate Green | Moderate Green | Greenish White |
| | Glu.A : | น้อย | Yellowish wthie | Yellowish wthie | Yellowish wthie |
| | N.A. | น้อย | Deep Yellowish Green | Very Light Greenish Blue | Pale Orange Yellow |

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora* บนอาหารต่างๆ

| รหัส | อาหาร | การเจริญ | สีของเส้นใยอาหาร | สีของเส้นใยอากาศ | สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ |
|---|---|---|---|---|---|
| PN51B-9-4 | ISP2 | ดี | Strong Orange Yellow | Strong Orange Yellow | Strong Orange Yellow |
| | ISP3 | น้อย | Dark Gray | Black | Dark Gray |
| | ISP4 | น้อย | Black | Black | Black |
| | ISP5 | น้อย | Greenish White | - | - |
| | ISP6 | ปานกลาง | Light Orange Yellow | Yellowish wthie | Brilliant Orange Yellow |
| | ISP7 | น้อย | Pale Orange Yellow | Light Greenish Gray | Light Greenish Gray |
| | Glu.A : | ปานกลาง | Light Greenish Gray | Light Greenish Gray | Light Greenish Gray |
| | N.A. | ปานกลาง | Vivid Orange Yellow | Vivid Orange Yellow | Vivid Orange Yellow |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# The NBS/IBCC Color System

## The 267 Color Centroids

| 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 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **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**

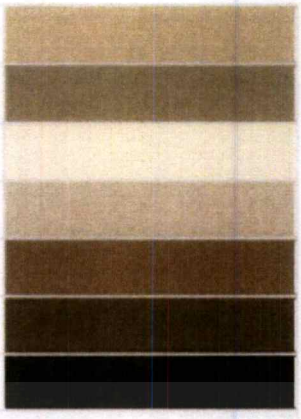
| | | | |
|---|---|---|---|
| **66 Vivid Orange Yellow** | 8.6yr 7.3 15.2 | #FF8E00 | |
| **67 Brilliant Orange Yellow** | 0.1y 8.1 10.5 | #FFB02E | |
| **68 Strong Orange Yellow** | 9.1yr 7.1 11.6 | #FF8E0D | |
| **69 Deep Orange Yellow** | 8.6yr 6.0 12.1 | #D76E00 | |
| **70 Light Orange Yellow** | 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 | |

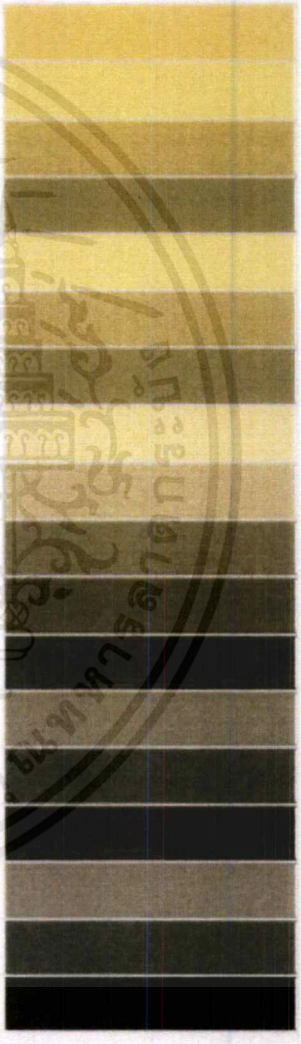
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **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 |



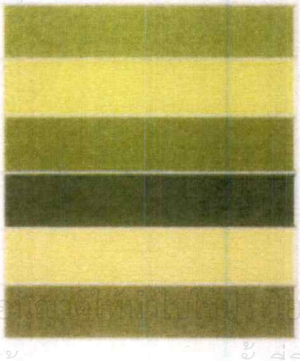
**Greenish Yellow, Olive**

| | | |
|---|---|---|
| **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 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **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 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **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 3.4 | #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 | #EADBC8 |
| **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** | 9.5rp 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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

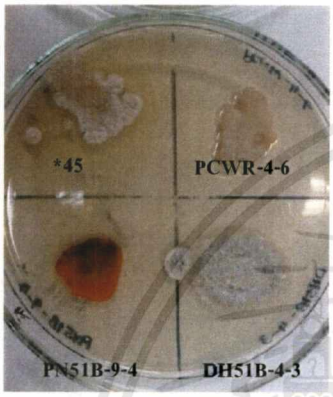
| | | | |
|---|---|---|---|
| **244 Pale Reddish Purple** | 1.3rp 6.0 4.2 | #AC7580 | |
| **245 Grayish Reddish Purple** | 1.0rp 4.5 4.2 | #7D4D5D | |
| | **Purplish Pink, Purplish Red** | | |
| **246 Brilliant Purplish Pink** | 6.0rp 8.5 11.0 | #FF97BB | |
| **247 Strong Purplish Pink** | 5.6rp 6.8 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 | #6E0035 | |
| **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 | #FEC9D7 | |
| **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 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

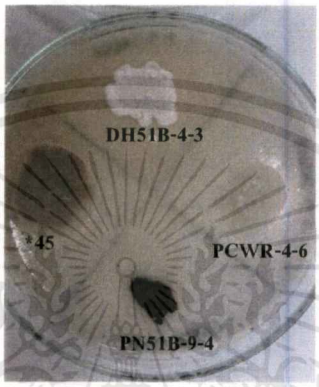
# ภาคผนวก จ

## รูปผลการวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

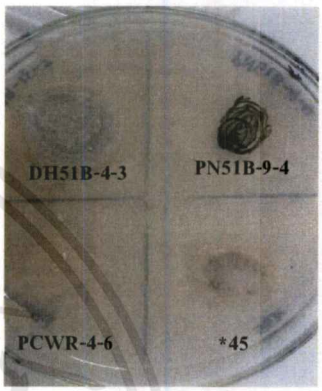
### 1. การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท



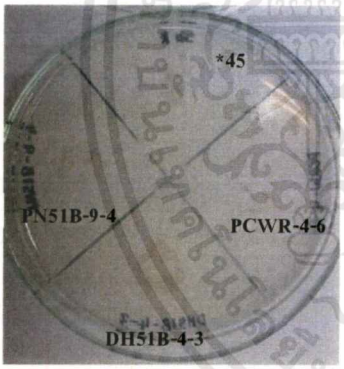

ISP2




ISP3

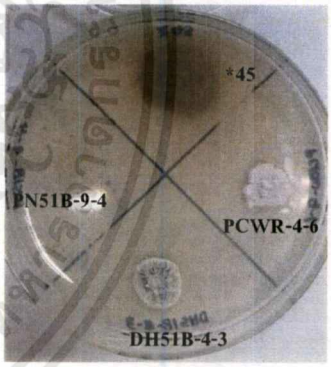



ISP4

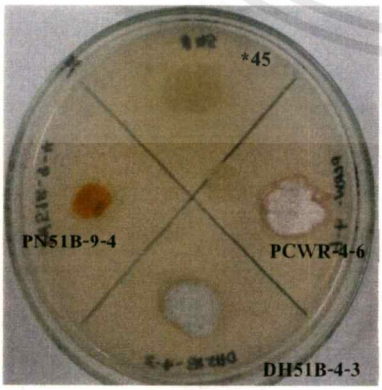



ISP5

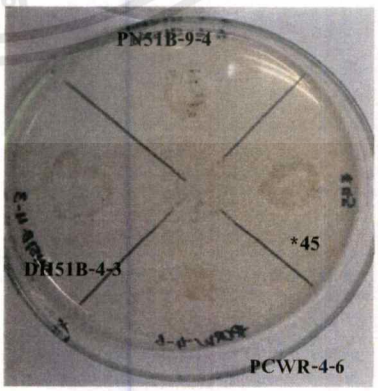
ISP6




ISP7




Nutrient agar

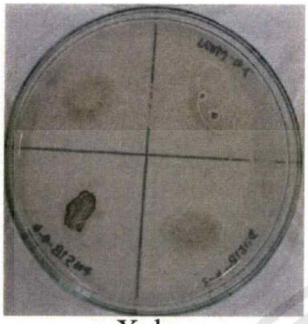



Glucose asparagine agar

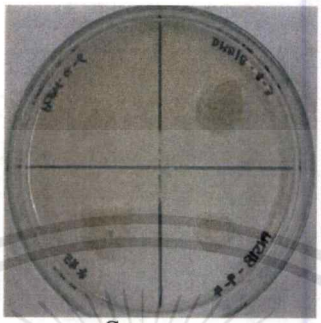
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

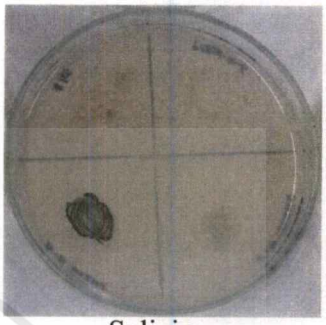
### การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)



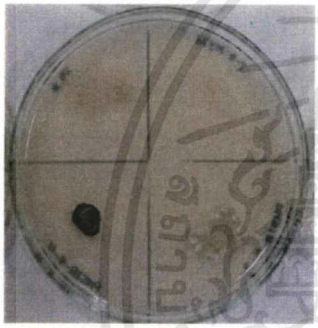
Xylose



Sucrose

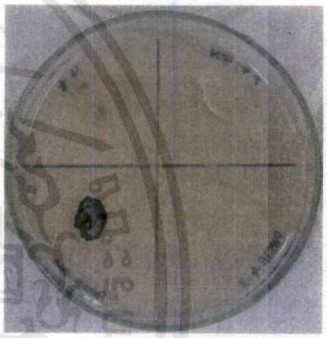


Salicin

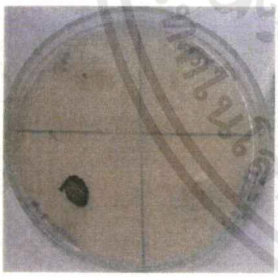


Rhamnose

Raffinose



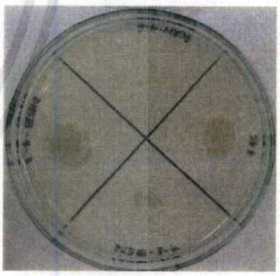
Melibiose



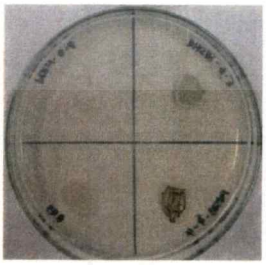
Galactose

Glycsrol

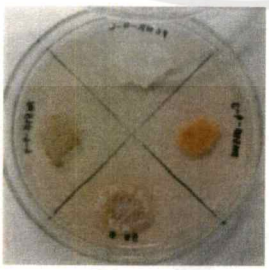
Fructose



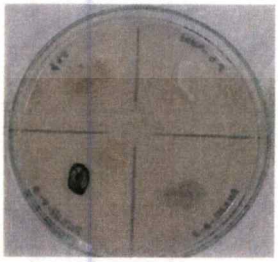
Arabinose



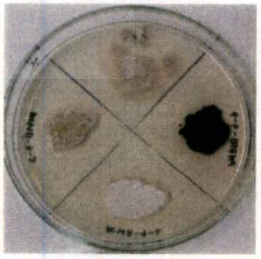
Mannose



Mannitol



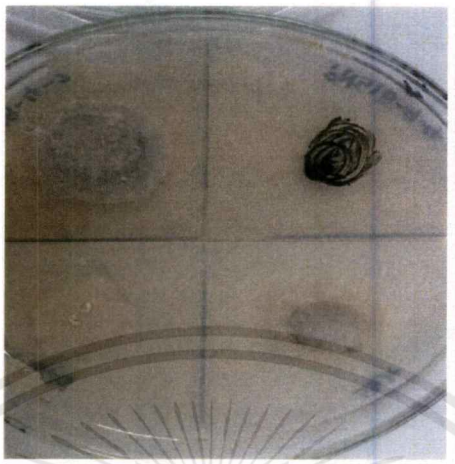
Maltose



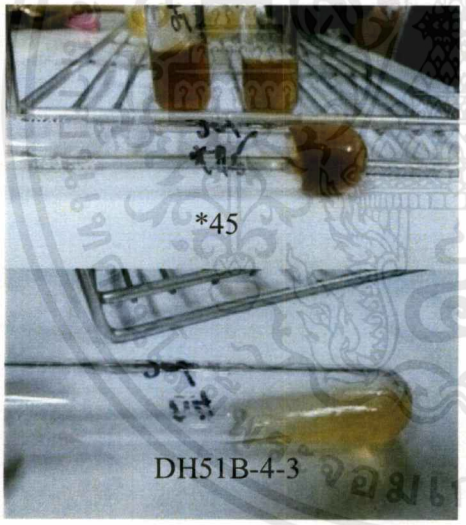
Lactose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

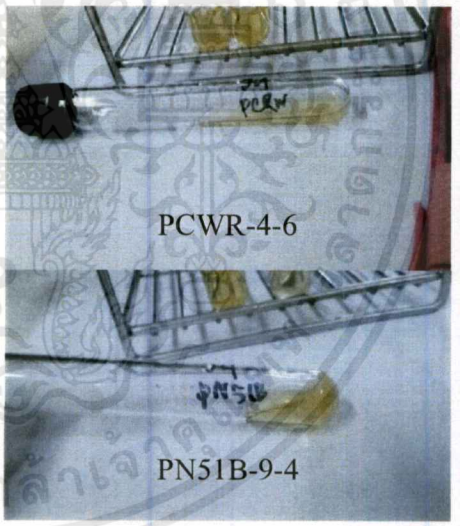
ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)



ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)



*45



PCWR-4-6



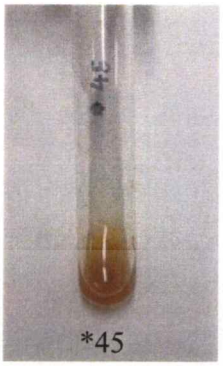
DH51B-4-3



PN51B-9-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

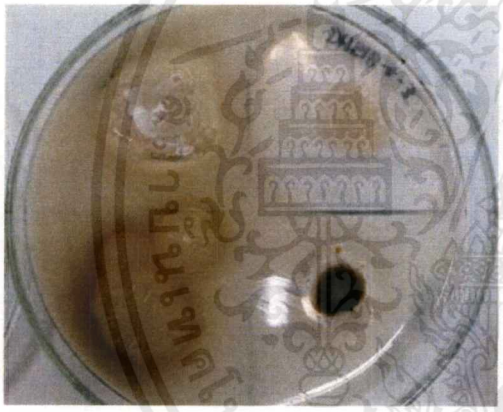

*45

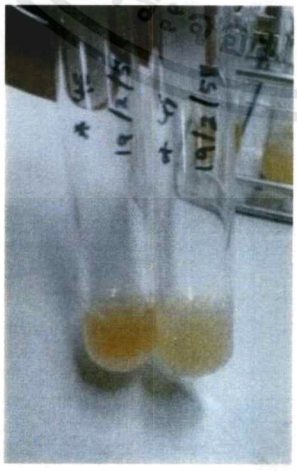
PCWR-4-6

DH51B-4-3

PN51B-9-4

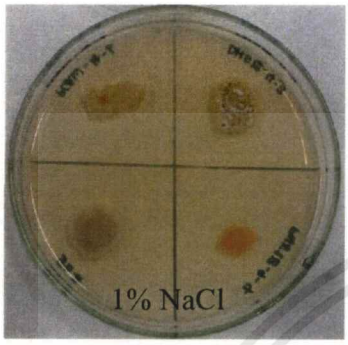
## ความสามารถในการย่อยโปรตีน

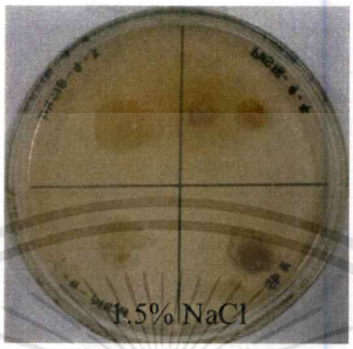


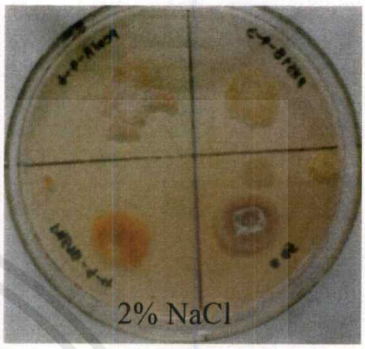


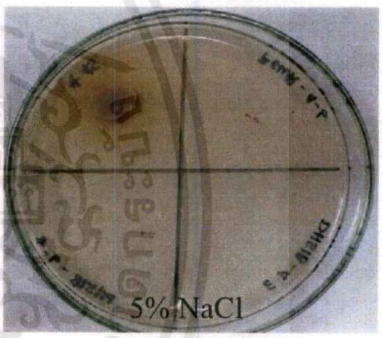
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

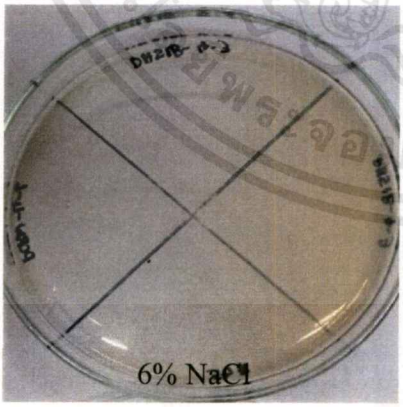
**ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ**



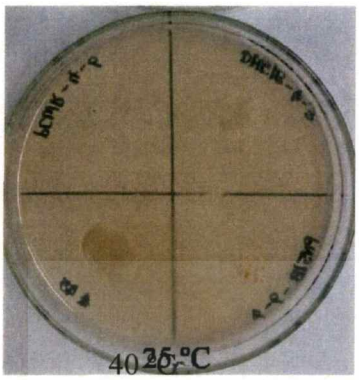



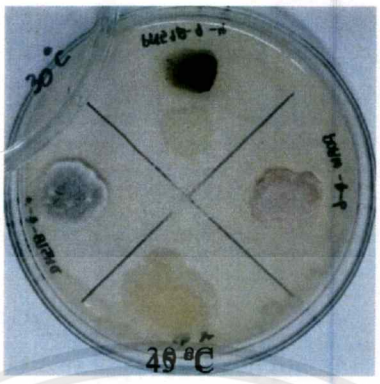


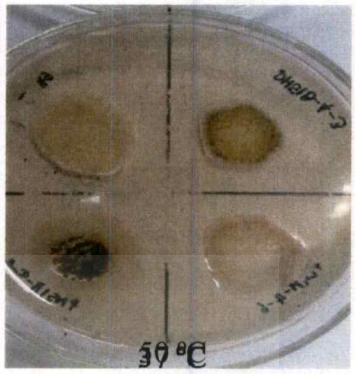



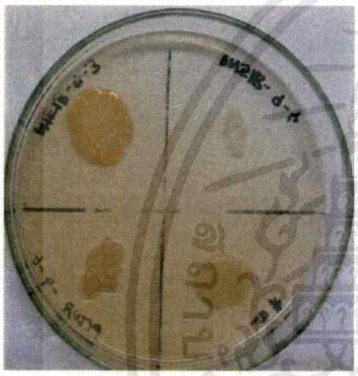
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

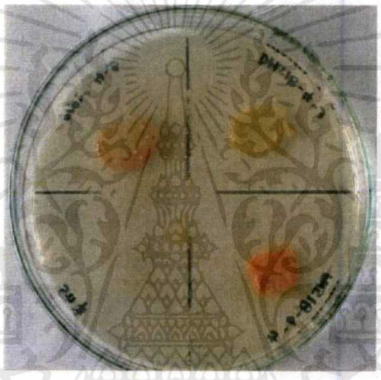
## ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

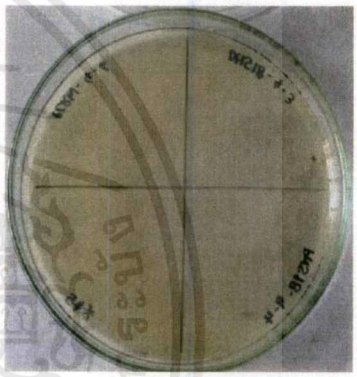


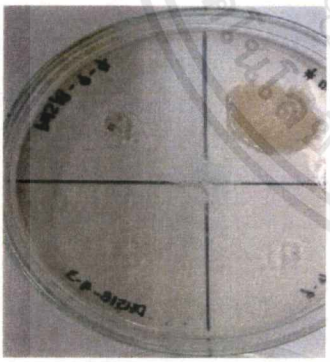





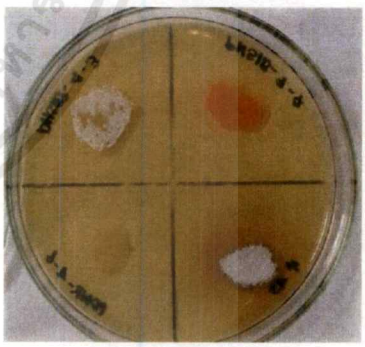


## ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ

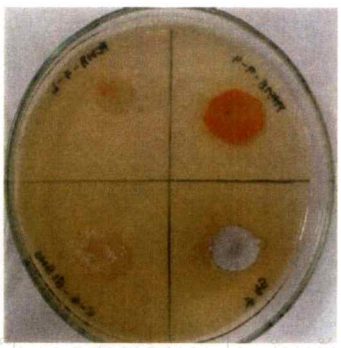


pH 4

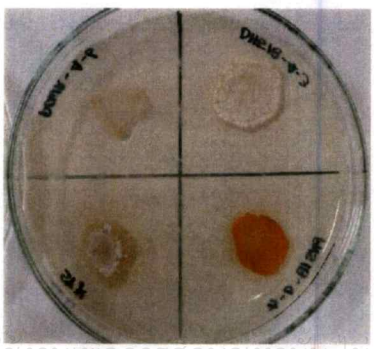
pH 5



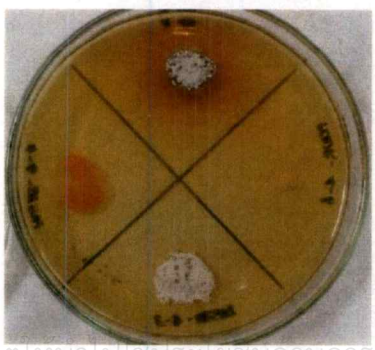
pH 6



pH 7



pH 8

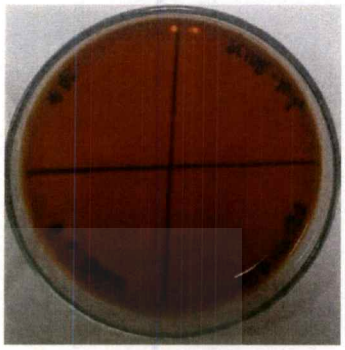


pH 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 10

pH 11



pH 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ฉ

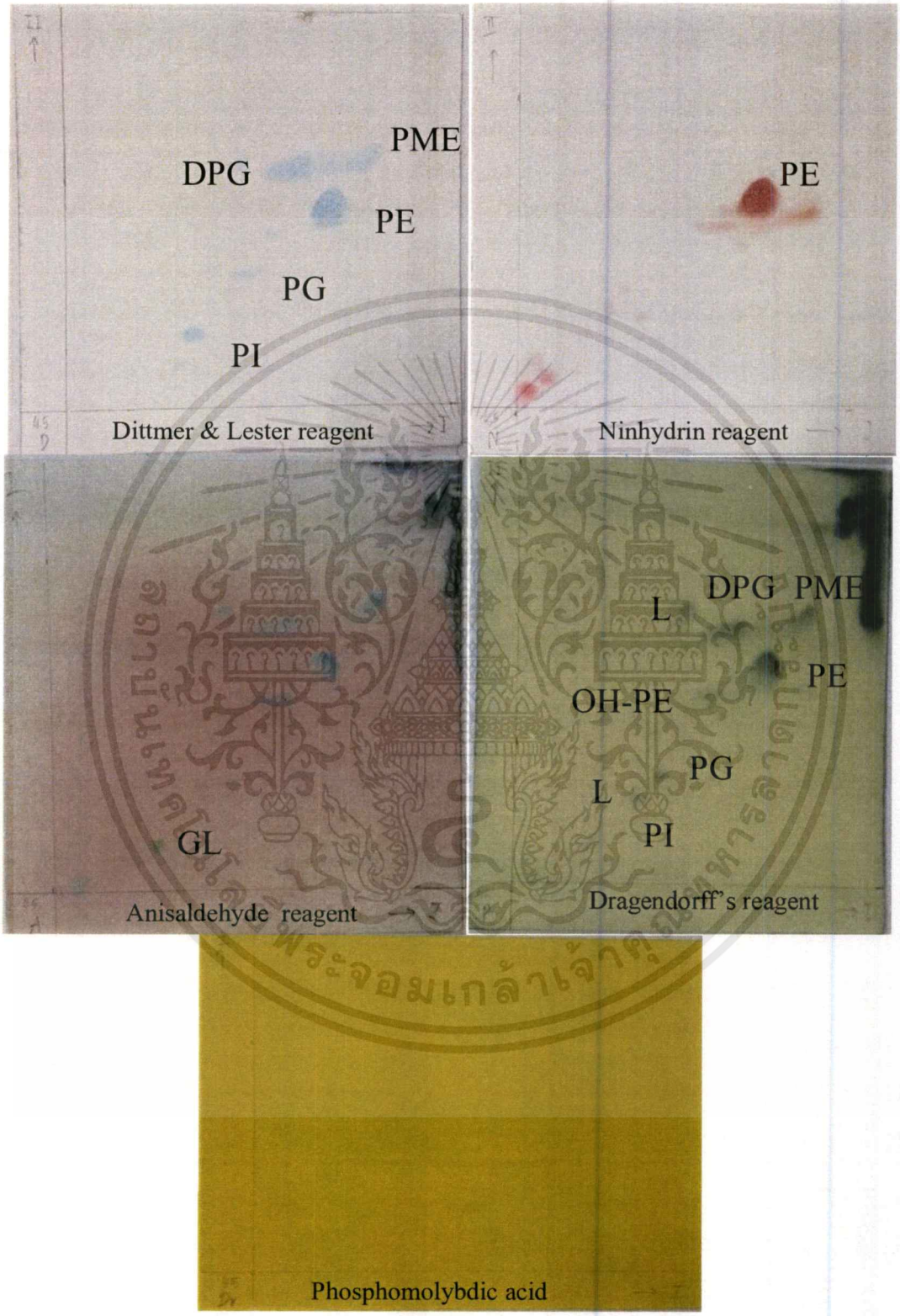
## รูปผลการวิเคราะห์ไขมันชนิดมีขั้ว (Polar lipid)

### คำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| PG | คือ | phosphatidylglycerol |
| DPG | คือ | diphosphatidylglycerol |
| PI | คือ | phosphatidylinositol |
| PIMs | คือ | phosphatidylinositol mannosides |
| PE | คือ | phophatidylethanolamine |
| PME | คือ | phophatidylmonomethylethanolamine |
| OH-PE | คือ | hydroxyl- phophatidylethanolamine |
| Lyso-PE | คือ | lysophophatidylethanolamine |
| PC | คือ | phophatidylcholine |
| GluNU | คือ | glucosamine containing phospholipids |
| PL | คือ | unknown phospholipid |
| PGL | คือ | unknown phosphoglycolipid |
| GL | คือ | unknown glycolips |

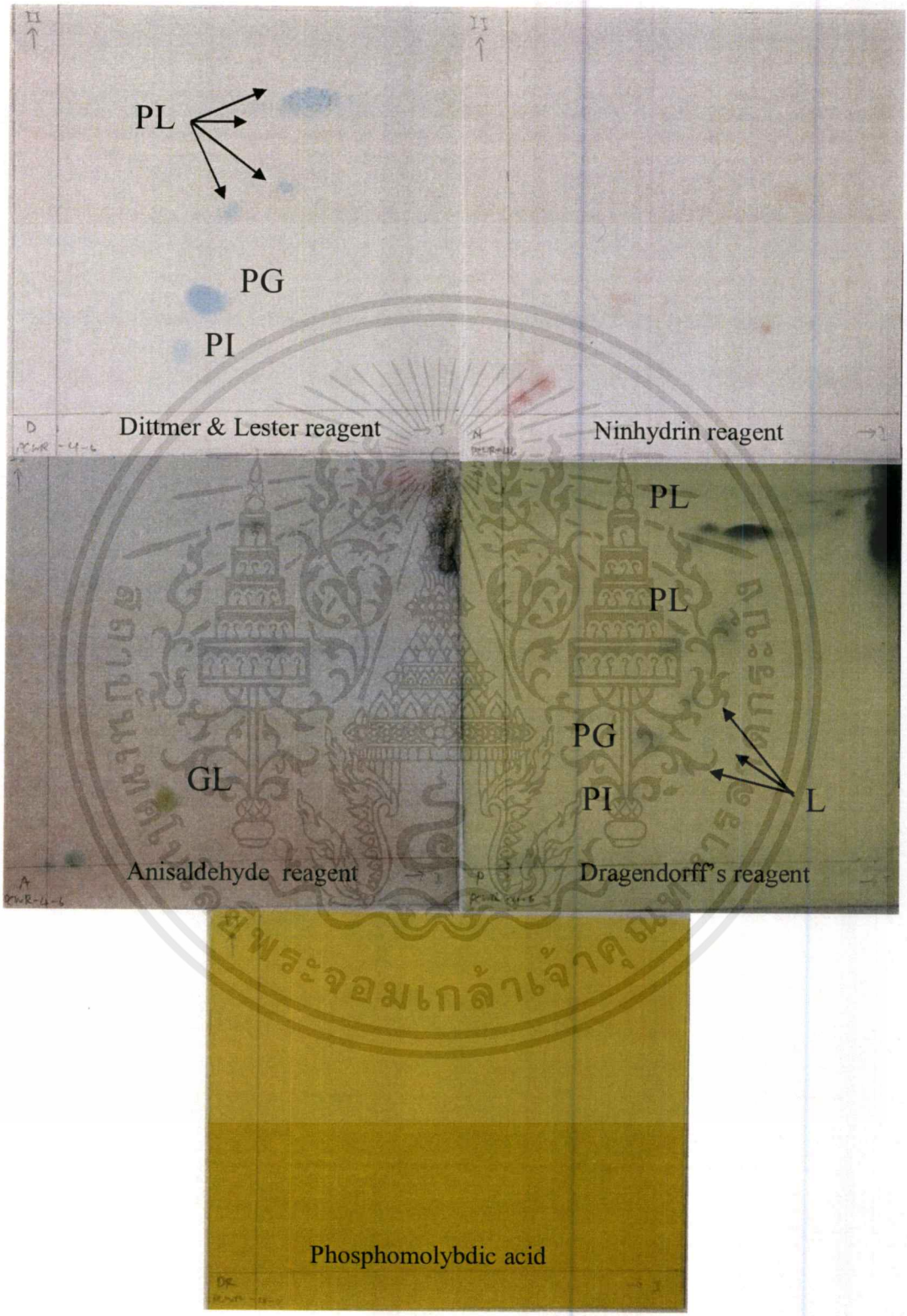
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต *45



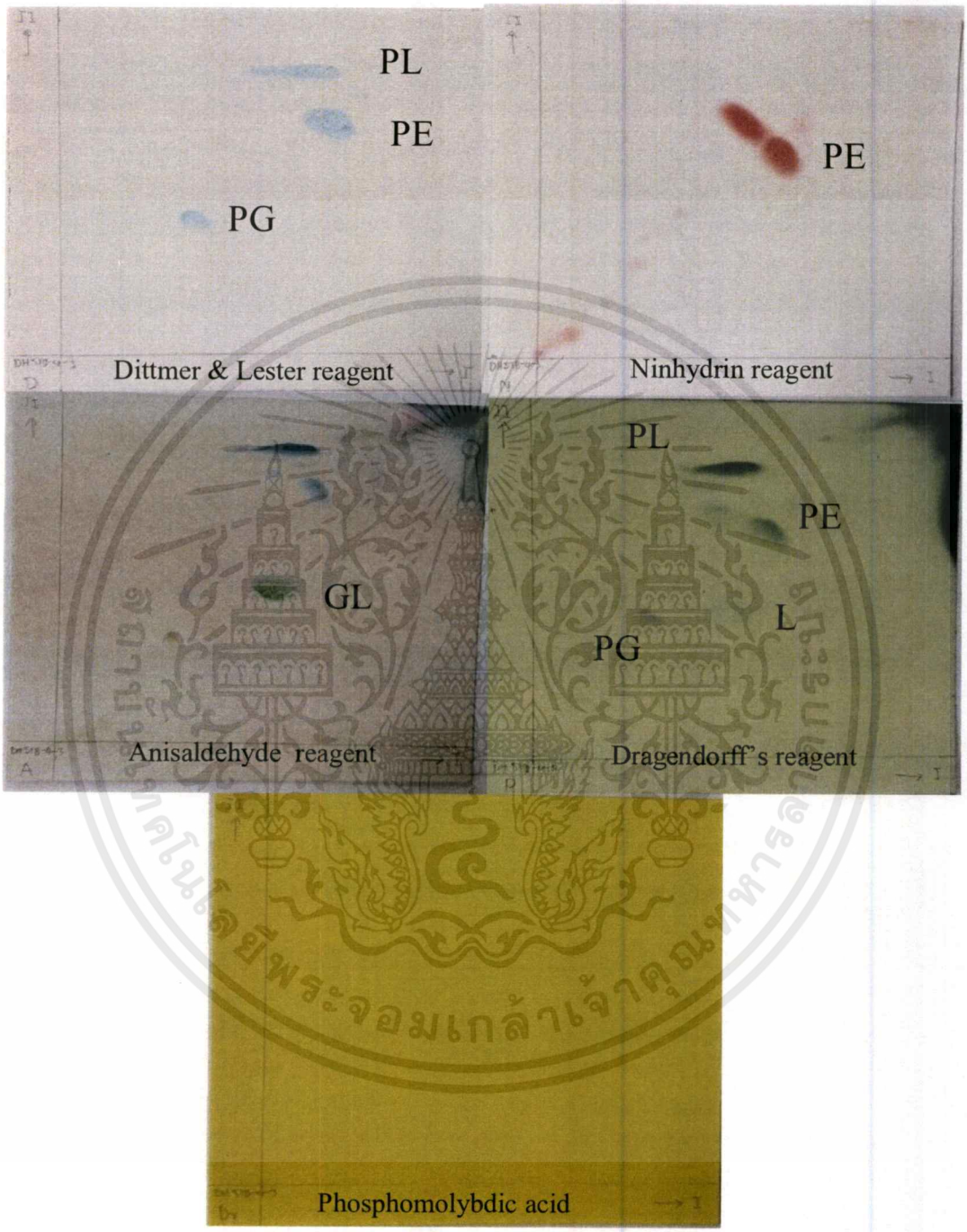

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต PCWR-4-6



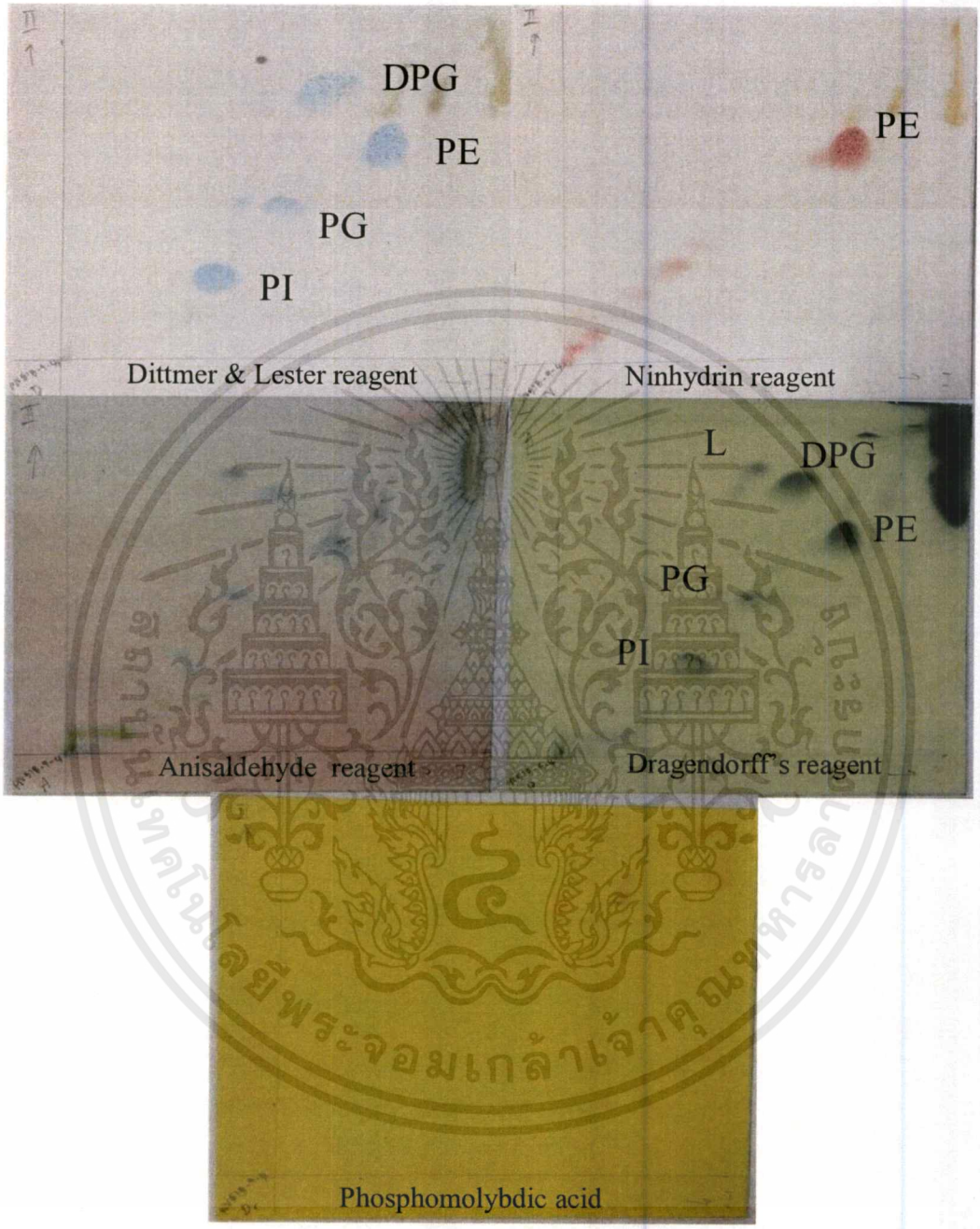

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต DH51B-4-3




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต PN51B-9-4




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ช

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

### ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต *45

GTTTGATTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTCGCAGGCATCTGCGAGGGTGAAAAGCTCCGGCGG
TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCAGTCGATACGGGC
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCG
TCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATG
TGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTC
ACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAA
TGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
CAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG
TGGGAGGGAGCT

### ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3

GTTTGATTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTGAAGCCACTTCGGTGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAATCTGTCCTGCACTCTGGGATAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTCTGCACCGCATGGTGTGGGGTGGAAAGTTCCGGC
GGTGCAGGGTGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
GCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTGCGTCGGCCGTGAAAACTGGAGGCTTAACCTTCAGCTTGCGGTCGATACGG
GCAGACTTGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCG
ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGCGACATCCACGT
TGTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCATCAGACAGCCGTAGAGATACGGTTTCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCGGG
AGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGC
TGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCCACGGCCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6

GTTTGATTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGAGCAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAGTCCTTGCATGAGGTGTTGGTGGAAAGTTTTTC
GGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAACCGGCCTGAGAGGGCGACCGGTCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCTAACGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGC
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGTCGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGGGTCTGCGGTGGATACGG
GCAGACTAGAGGCAGGTAGGGGAGAATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCT
GTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCCTTCCACGG
ATTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCGCCGGAAAACCATCAGAGATGGTGGGTCCTTTTTGGGCCGGTGACAGGTGGT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGGACTCATGGG
AGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGC
TGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACCTTGTGTG
GGGGGA

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PN51B-9-4

AGTTTGATTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACTCCTGGTCGCATGACCGGGAGTGGAAAGTTTTTCGG
CCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGATTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGC
GAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGC
AGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGAT
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCCTCTCCGGTT
CCCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCA
TGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACTCACAGAGATGTGAGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAA
GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCT
GCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC
AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGG
AGCCGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้