

ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่
แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

Neuroprotective activity of crude extract of *Microbispora* isolate
from Thai medicinal plant



โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neuroprotective activity of crude extract of *Microbispora* isolate
from Thai medicinal plant



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปะลงเว็บไซต์หรือช่องทางอื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ

ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของ
เชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร
Neuroprotective activity of crude extract of
Microbispora isolate from Thai medicinal plant

นักศึกษา

นางสาวฉัตรทริกา มูลมาก รหัสนักศึกษา 55051071
นางสาวณัฐนันท์ ทรงศรี รหัสนักศึกษา 55051089
นางสาวภัทรานิษฐ์ แผงพงศ์ รหัสนักศึกษา 55051147

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศดี ประธานกรรมการ	
ดร.ดวงกมล เรืองงาม กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการ	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของ เชื้อไมโครไบสพอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฉัตรทริกา	มุลมาก	รหัสนักศึกษา 55051071
	นางสาวณัฐนันท์	ทรงศรี	รหัสนักศึกษา 55051089
	นางสาวภัทรานิษฐ์	แฝงพงศ์	รหัสนักศึกษา 55051147
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติ ท่าไว		

บทคัดย่อ

เชื้อแอกติโนมัยสีท จำนวน 18 ไอโซเลต ถูกแยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย เชื้อเหล่านี้ถูกระบุชนิดระดับสกุลเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ข้อมูลของยีน 16S rRNA ผลที่ได้พบว่าทุกเชื้อเป็นสมาชิกในสกุลไมโครไบสพอรา น้ำหมักเชื้อของสายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3 และ KM1-2 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต สารสกัดหยาบที่ได้ถูกทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่สามารถปกป้องเซลล์ประสาท P19 จากสภาวะเครียด ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อทั้งสี่ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้ คิดเป็นร้อยละ 47.58 35.09 39.31 และ 33.99 ตามลำดับ

คำสำคัญ : แอกติโนมัยสีท เซลล์ประสาท P19 ไมโครไบสพอรา ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท

ออกซิเดทีฟสเตอร์ท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Neuroprotective activity from crude extract of <i>Microbispora</i> isolated from Thai medicinal plants
Students	Miss Chattharika Moonmak Miss Natthanan Songsri Miss Pattranit Faengphong
Degree	Bachelor of Science
Program	Biotechnology
Academic Year	2015
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

Abstract

Eighteen actinomycete strains were isolated from the tissue of Thai medicinal plants. These strains were tentatively identified into the genus-level using morphological characteristic and 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analyses. The results showed that all strains belonged to the member of the genus *Microbispora*. The fermentation broths of the selected *Microbispora* strains, CL1-1, CL2-2, KE1-3 and KM1-2 were extracted with ethyl acetate (EtOAc). The crude ethyl acetate extracts were tested for the capacity to produce compounds which can protect neurons from oxidative stress in P19 neurons. The results revealed that the crude extract at concentration of 1 ng/ml of all four isolates could protect P19 neurons from oxidative stress reached to 47.58%, 35.09%, 39.31% and 33.99%, respectively.

Keywords : Actinomycetes, P19 neurons, *Microbispora*, Neuroprotective activity
Oxidative stress

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงการพิเศษเรื่อง ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบโสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย คณะผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำคำปรึกษามาโดยตลอด และให้ความอนุเคราะห์เชื้อไมโครไบโสปอราทั้ง 18 ไอโซเลตสำหรับการทดลอง ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สริน ทัดทอง อาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจฤทธิ์การกระตุ้นประสาท และขอขอบพระคุณคณะกรรมการทั้ง 2 ท่าน ได้แก่ ดร.คณิงการต์ กลั่นบุศต์ และ ดร.ดวงกลม เรืองงาม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้จุดบกพร่องแก้ไขข้อผิดพลาดที่คณะผู้จัดทำมองข้ามไปหลายจุด ซึ่งทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีคุณภาพและความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด จนสามารถทำให้โครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง กราบขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สิ่งสำคัญที่ขาดไม่ได้เลยนั่นก็คือคุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นบุพการีที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

นางสาวฉัตรชริกา มุลมาก

รหัสนักศึกษา 55051071

นางสาวณัฐนันท์ ทรงศรี

รหัสนักศึกษา 55051089

นางสาวภัทรานิชษฐ์ แฝงพงศ์

รหัสนักศึกษา 55051147

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แอคติโนมัยซีท	3
2.1.1 ประโยชน์ของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท	6
2.2 ประวัติ และลักษณะของเชื้อสกุลไมโครโสปอรา	6
2.2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุลไมโครโสปอรา	7
2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	7
2.2.1.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ของอนุกรมวิธานแบคทีเรีย	9
2.2.1.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์	19
2.2.2 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว	21
2.2.2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	21
2.2.3 สารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุลไมโครสปอรา	23
2.2.4 ประโยชน์ของเชื้อสกุลไมโครโสปอรา	23
2.3 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	24
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	27
3.1 อุปกรณ์	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3.3 สารเคมี	28
3.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล <i>Microbispora</i> spp.	29
3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์	29
3.4.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท	29
3.4.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีท	29
3.4.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์	30
3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	30
3.5.1 การหมักเชื้อเพื่อให้เกิดสารและการสกัดสาร	30
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท	30
3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฟิสิบเก้า	30
3.5.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์ฟิสิบเก้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทฟิสิบเก้า	30
3.5.2.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	33
4.1 การศึกษาอนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา	33
4.2 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเชื้อไมโครไบสปอรา	79
4.2.1 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท	79
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท	80
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	82
บรรณานุกรม	84
ภาคผนวก ก	88
ภาคผนวก ข	93
ภาคผนวก ค	110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	จำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ	4
2.2	จำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท	4
2.3	รูปแบบของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท	11
2.4	ภาพฟอสโฟลิปิดที่พบในแบคทีเรีย	13
2.5	ชนิดฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอสคิโนมัยซีท	14
2.6	รูปแบบของกรดไขมันในเซลล์	15
4.1	ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท เมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL	79
4.2	ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท เมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	สปอร์ของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) เกิดจากสปอร์ต่อกันเป็นคู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น	8
2.2	โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด	12
2.3	โครงสร้างของกรดไมโคลิก	16
4.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AN2-5	34
4.2	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-5 และ ZZ1-4 บน phylogenetic tree	35
4.3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BR3-3	37
4.4	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-3 บน phylogenetic tree	38
4.5	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL1-1	40
4.6	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-3 บน phylogenetic tree	41
4.7	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL2-2	43
4.8	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL2-2 และ KM1-2 บน phylogenetic tree	44
4.9	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CS-R-4	45
4.10	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-2	47
4.11	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-2 และ ZO1-7 บน phylogenetic tree	48
4.12	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-3	50
4.13	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-3 และ ZZ2-2 บน phylogenetic tree	51
4.14	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-2	53
4.15	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE2-2 และ BR3-3 บน phylogenetic tree	54
4.16	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-4	56
4.17	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE2-4 บน phylogenetic tree	57
4.18	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-5	58
4.19	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KK1-10	59
4.20	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KK1-11	61
4.21	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KK1-11 บน phylogenetic tree	62
4.22	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-1	64
4.23	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KM1-1 บน phylogenetic tree	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.24	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-1	67
4.25	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KM1-2 และ CL2-2 บน phylogenetic tree	68
4.26	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZO1-7	70
4.27	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZO1-7 และ KE1-2 บน phylogenetic tree	71
4.28	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ-H-4	72
4.29	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ1-4	74
4.30	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZZ1-4 และ AN2-5 บน phylogenetic tree	75
4.31	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ2-2	77
4.32	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZZ2-2 บน phylogenetic tree	78
4.33	ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท เมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL	80
4.34	ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท เมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย

จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระบวนการเมตาบอลิซึมที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ได้หลายชนิด โดยที่ผ่านมานั้นแอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญในช่วงค.ศ.1960 ถึง 1970 ซึ่งการค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีทมีมากถึงร้อยละ 75-80 ของการค้นพบสารปฏิชีวนะทั้งหมด (Coyne, 1990) จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและบางชนิดสามารถพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้

ปัจจุบันพบปัญหาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบมากขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้เกิดปัญหาด้านการรับรู้และความเข้าใจ (cognitive dysfunction) พบมากในผู้สูงอายุ และยังเพิ่มความรุนแรงของอาการมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของวงการสาธารณสุขโลก จึงมีการศึกษาค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิดที่ช่วยป้องกันและรักษาโรค ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ เกิดจากการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายจากการเหนี่ยวนำของเบต้า-อไมลอยด์ (β -Amyloid induced oxidative stress) (Kim et al., 2001)

พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทมีบทบาทที่สำคัญในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี และนอกจากนี้ยังค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อที่อยู่ในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่ช่วยลดการสะสม β -Amyloid ภายในสมอง โดยมีแนวโน้มที่ช่วยลดการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ (Bahareh Eftekhazadeh et al., 2010) และยังมีงานวิจัยที่พบว่าเชื้อที่อยู่ในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) บางชนิดสามารถสร้างสาร 3-Normeridamycin (Mia Y. Summers et al., 2006) รวมทั้งสาร Corprismycin ชนิด A และ B ได้ (Seong-Hwan Kim et al., 2011) ซึ่งมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากการขาดสารโดปามีนในสมอง จึงช่วยลดอัตราการเกิดโรคพาร์กินสันได้ ซึ่งเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) และเชื้อที่อยู่ในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) จัดอยู่ใน กลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีท จึงคาดว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) จะสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทได้เช่นเดียวกัน

จากความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้กล่าวมานั้น งานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นในการหาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ซึ่งเป็นสกุลหนึ่งที่ผลิตสารทุติยภูมิได้ และมีการศึกษาไม่มากนัก เนื่องจากเชื้อในสกุลนี้เป็นเชื้อที่หายากเพราะการกระจายตัวของเชื้อในแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดินมีน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อสกุลอื่นที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และทำการแยกสารเป็นส่วนๆ (fraction) ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ตลอดจนศึกษาอนุกรมวิธาน และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เพื่อเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญที่จะนำไปศึกษาด้านเภสัชศาสตร์เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องประสาทที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* sp.

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาอนุกรมวิธาน ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจีโนมไทป์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* spp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบฤทธิ์ปกป้องประสาทที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* spp.

1.4.2 สามารถเรียนรู้และทราบถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อไมโครไบสปอราได้อย่างเหมาะสม เพื่อนำไปปรับใช้ในการเลี้ยงเชื้ออื่นๆต่อไปในอนาคต

1.4.3 โครงการพิเศษนี้จะนำไปใช้ในการพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ และเป็นประโยชน์ต่อวิทยาศาสตร์สาธารณสุขสาขาอื่นได้

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.5.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่นำมาศึกษา

1.5.2 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Microbispora* spp. ที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย

1.5.3 สกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Microbispora* spp.

1.5.4 นำสารสกัดหยาบจาก เชื้อ *Microbispora* spp. ทดสอบฤทธิ์ปกป้องประสาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทอยู่ในชั้นแอกติโนแบคทีเรีย (Class Actinobacteria) อันดับ Actinomycetales (Miyadoh, 1997) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในชั้นย่อยแอกติโนแบคทีเรีย (Subclass Actinobacteridae) ในดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสีทมีปริมาณสาร G+C ใน GC content อยู่ 57-75 เปอร์เซ็นต์ (Lo et al., 2002) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะพื้นฐานที่คล้ายคลึงกับเชื้อราและแบคทีเรียคือ มีการเจริญเป็นเส้นใย ในการสร้างเส้นใยนั้นจะแบ่งเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เพื่อดูดซึมสารอาหารจากสิ่งแวดล้อมเพื่อการเจริญและเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยเส้นใยอากาศนั้นพัฒนาเป็นสปอร์ สปอร์ของแอกติโนมัยสีทเป็นสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ มีคุณสมบัติทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานานแต่สปอร์ของเชื้อจะไม่สามารถทนร้อนได้มากนัก แต่ก็มีเชื้อแอกติโนมัยสีทบางชนิดที่ไม่มีการสร้างเส้นใยอาหาร ในส่วนของความคล้ายคลึงแบคทีเรียนั้นพบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทหนึ่งเซลล์ประกอบด้วยมิวโคเปปไทด์ (mucopolysaccharide) ที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มไมโครแบคทีเรีย (Mycobacterium) อีกทั้งยังไม่มีเนื้อหุ้มไมโตคอนเดรีย และไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

แอกติโนมัยสีทสามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ โคลน ในพืชหรือสามารถกล่าวได้ว่าสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยแหล่งที่พบมากที่สุดได้แก่บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น บริเวณน้ำพุ ป่าชายเลน หรือใต้ทะเล และยังพบมากในดินรอบรากพืช (rhizosphere) โดยมีมากกว่า 100 สกุล ของเชื้อแอกติโนมัยสีทพบมากในดินที่มีค่าความกรด-ด่างระหว่าง 6.5-8.0 หลังจากมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอกติโนมัยสีทครั้งแรกเมื่อ 50 กว่าปีก่อน (Schatz et al., 1944) ประโยชน์ของแอกติโนมัยสีทนั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมาย จากข้อมูลพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยสีทร้อยละ 45 เชื้อราร้อยละ 38 และแบคทีเรียร้อยละ 17 (Berdy, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ

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

(ที่มา : Berdy ,2005)

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดคือเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) (ตารางที่2.1) ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะ ได้ร้อยละ 70 (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) ผลิตได้ร้อยละ 5 (740 ชนิด) แอกติโนมัยซีทพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไปโดยเฉพาะในดินบนบก สิ่งมีชีวิตชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายซากพืชและสัตว์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ

ตารางที่ 2.2 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอกติโนมัยซีท

<i>Streptomycetaceae:</i>	ชนิด	<i>Thermomonosporaceae:</i>	
<i>Streptomyces</i>	8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellbosporia</i>	11	<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Micromonosporaceae:</i>		<i>Micropolyspora/faenia</i>	13/3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Actinoplanetes)		<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Thermopolyspora</i>	1
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Dactylosporangium</i>	58		
<i>Ampullariella</i>	9		
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Mycobacteriaceae:</i>	
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>(Actinobacteria)</i>	
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Nocardia</i>	(357)
		<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Pseudonocardiaceae :</i>		<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Pseudonocardia</i>	27		
<i>Amycolata</i>	12	Other)unclassified (species:	
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Antinopolyspora</i>	1	<i>Microellbosporis</i>	11
		<i>Frankia</i>	7
<i>Streptosporangiaceae:</i>		<i>Westerdykella</i>	6
<i>(Maduromycetes)</i>		<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Synnemonyces</i>	4
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Sebekia</i>	3
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Planobispora</i>	10	<i>Excelsospora</i>	3
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Waksmania</i>	3
<i>Planomospora</i>	2	<i>Alkalomyces</i>	1
		<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1

(ที่มา : Bérdy, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ประโยชน์ของเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีท

ประโยชน์ของเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทนี้มีประโยชน์ เช่น ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในดินทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ แอกติโนมัยซีทมีบทบาทต่อระบบนิเวศน์ของดินโดยช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น เซลลูโลส เช่นเดียวกันกับเชื้อราแต่จะเจริญหลังจากที่เชื้อรา และแบคทีเรียได้เจริญเต็มที่ และลดจำนวนลงแล้ว ตั้งแต่ช่วงปลายทศวรรษ 1970 เป็นต้นมาพบว่าแอกติโนมัยซีทตรึงก๊าซไนโตรเจนได้โดยการอยู่ร่วมกับรากพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้เขตอบอุ่นประเภทผลไม้เนื้ออ่อน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอกติโนมัยซีทบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ร่วมกับรากข้าวในนาข้าวซึ่งไม่เฉพาะเจาะจงเหมือนกับแบคทีเรียไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่วเท่านั้น นอกจากนี้ที่ช่วยสลายสารอินทรีย์แล้วยังมีความสำคัญทางการแพทย์ และทางอุตสาหกรรม โดยสามารถนำมาผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Goodfellow และคณะ, 1988)

2.2 ประวัติ และลักษณะของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ได้ถูกจัดอยู่ในแฟมิลีสเตรปโตสปอแรนเจียซีอี (*Streptosporangiaceae*) ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อสกุลแอกติโนคาโปสปอรา (*Actinocapospora*) คาวิสพอแรนเจียม (*Clavisporangium*), เฮอร์บิดสปอรา (*Herbidospora*) ไมโครเตตสปอรา (*Microtetraspora*) โนนโมราอี (*Nanomorae*) พลาโนไบสปอรา (*Planobispora*) สเฟียโรสปอแรนเจียม (*Sphaerosporangium*) สเตรปโตสปอแรนเจียม (*Streptosporangium*) เทอร์โมโพลีสปอรา (*Thermopolyspora*) อะโครคาโปสปอรา (*Acrocarpospora*) และไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ซึ่งเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) นี้จะมีลักษณะที่ต่างออกไปจากเชื้อสกุลอื่นๆในแฟมิลีนี้คือ สามารถสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ สปอร์มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร มีสีของเส้นใยอาหารเป็นสีแดงอมชมพูจนถึงชมพูอมน้ำตาล สีของเส้นใยอากาศคือ สีชมพูและสามารถสร้างรงควัตถุบนอาหารสีเหลืองอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

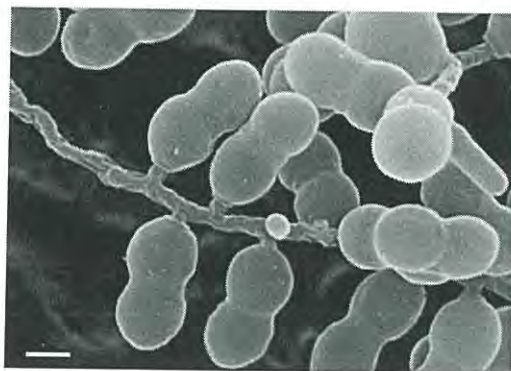
2.2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

องค์ประกอบของทางเคมีของเซลล์แอคติโนมัยซีทจำแนกจากประเภทของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ เปปติโดไกลแคนในแอคติโนมัยซีทแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A เป็นการเชื่อมสายกรด N-acetylmuramic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 3 กับ 4 และกลุ่ม B เชื่อมตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2 กับ 4 ส่วนกรดอะมิโนหลักที่ผนังเซลล์แบ่งเป็นหลายประเภท ส่วนใหญ่เป็นกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid; DAP) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์คือ LL-DAP และ meso-DAP สำหรับองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมันแบ่งเป็นกรดไขมันฟอสโฟลิปิด (มี 5 ประเภทคือ PI-PV) (Goodfellow และ O'Donnell, 1993) และอนุพันธ์ของมีนาควิโนน (menaquinone) ประเภทต่างๆ สำหรับน้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนส กาแลกโตส มาตูโรส และไซโลส เป็นส่วนใหญ่

2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมี (Biochemical and Physiological characteristics) ของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) สามารถสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) ที่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร (Nonomuura, 1989) จากการศึกษาลักษณะสปอร์ที่ต่อกันเป็นคู่นี้ใช้เป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ถึงแม้ว่ายังมีเชื้อสกุลอื่นที่สามารถสร้างสปอร์ในลักษณะนี้ถึงบริเวณรอยคอดของสปอร์ก็ตาม แต่ลักษณะของสปอร์ก็จะมี ความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยทั่วไปก็มีสีของเส้นใยอาหาร (substrate hypha) ในโทนสีขาวอมเหลืองถึงน้ำตาล สีของเส้นใยอากาศ (aerial hypha) สีขาวถึงชมพูแดง บางสปีชีส์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (soluble pigment) สีเหลืองอมน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงสปอร์ของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) เกิดจากสปอร์ต่อกันเป็นคู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น (Hayakawa และคณะ, 1991)

ในช่วงต้นของการพัฒนาเป็นสปอร์จะมีรูปร่างเป็นแท่งกลม (club-shaped) หลังจากนั้นจะเกิดการคอดของเซลล์ทำให้เป็นเป็นสปอร์คู่และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ผิวสปอร์เรียบ เมื่อแก่จัดมักหลุดออกจากก้านชูสปอร์ (sporohore) ได้ง่าย ต้องการวิตามินบีโดยเฉพาะไทเอมีน (thiamine) ในการเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นสปอร์

ลักษณะการเจริญของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ส่วนใหญ่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 17 ถึง 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นในกลุ่มของไมโครไบสปอรา โรซีเอ (*Microbispora rosea*) ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) บางสายพันธุ์สามารถย่อยเคซีน (casein) และเอสคูลิน (aesculin) ได้แต่ไม่สามารถสลายอะดีนีน (adenine) อีลาสติน (elastin) กัวนีน (guanine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เคราติน (keratin) เทสโทสเตอโรน (testosterone) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) แซนทีน (xanthine) ไชลแลน (xylan) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ได้ ส่วนการใช้สารประกอบคาร์บอนพบว่าส่วนใหญ่เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) สามารถใช้อะมิกลาดาลิน (amygdalin) แอล-อะราบีโนส (L-arabinose) อาร์บูติล (arbutin) ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) ดี-กาแลกโตส (D-galactose) ดี-กลูโคส (D-glucose) มอลโตส (maltose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-เมเลซีโทส (D-melezitose) ดี-เมลลิไบโอส (D-melibiose) เมทิล แอลฟา ดี-ไกลโคไซด์ (Methyl α -D-glucoside) ดี-ไรโบส (D-ribose) ซาลิซิน (salicin) ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbital) แอล-ซอร์บิทอล (L-sorbital) แป้ง (starch) ซูโคส (sucrose) ดี-ทีฮาลอส (D-trehalose) และ ดี-ไซโลส (D-xylose) แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ เช่น อะโดนิทอล (adonitol) ดี-อะราบิทอล (D-arabitol) ดัลซิทอล (dulcitol) ไอโซ-อีริทริทอล (Iso-erythritol) อินูลิน (Inulin) ดี-ราฟฟิโนส (D-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

raffinose) แอล-แรมโนส (L-rhamnose) หรือไซลิตอล (xylitol) สำหรับกรดอินทรีย์ที่เชื่อมส่วนใหญ่ในสกุลนี้สามารถใช้ได้คือ กรดฟูรามิก (fumamic acid) กรดมุซิก (mucic acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) หรือกรดตารตาริก (L-tartaric acid) ในการเจริญเติบโตได้ (Nakajima, 1999)

2.2.1.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ของอนุกรมวิธานแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ทำหน้าที่ที่สำคัญคือ ทำให้แบคทีเรียสามารถคงรูปอยู่ได้ และช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตกเนื่องจากความแตกต่างของแรงดันออสโมซิสระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์พบว่าเซลล์จุลินทรีย์จะประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น ลิโปโพลีแซกคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์จัดเป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มีองค์ประกอบของแบคทีเรียแกรมบวกนั้นสามารถดูชนิดของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์โดยวิเคราะห์ที่รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมิลิก (Diaminopimelic acid isomer) ที่เป็นองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ในผนังเซลล์ ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และกรดเอ็น-อะซีทิลมูรามิก (N-acetylmuramic acid) เกาะเรียงกันเป็นสายยาวสลับกันไป และบริเวณกรดเอ็น-อะซีทิลมูรามิกจะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน กรดอะมิโนนี้จะไปเชื่อมกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซีทิลมูรามิกอีกโมเลกุลหนึ่งโดยอาศัยพันธะเปปไทด์เป็นตัวเชื่อม จึงเรียกว่า อินเตอร์เปปไทด์บริดจ์ (Interpeptide bridge)

เมื่อพิจารณาลักษณะไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนพิมิลิกในส่วนของผนังเซลล์แล้วสามารถจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ เชื้อแอคติโนมัยซีททั่วไป (Common actinomycetes) พบในกลุ่มสเตรปโตมัยซีอี (Streptomyceae) ได้แก่ สกุลสเตรปโตมัยเซส (Streptomyces) ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมิลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ *LL*-Diaminopimelic acid และเชื้ออีกกลุ่ม คือเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยเซส (Non-Streptomyces) หรือแอคติโนมัยซีทหายาก (Rare actinomycetes) ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมิลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ *meso*-Diaminopimelic acid ได้แก่ เชื้อสกุลอื่นทั้งหมดที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยเซส (Non-Streptomyces) รวมถึงเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) นอกจากนี้ตรงตำแหน่งของกรดไดอะมิโนพิมิลิกอาจถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนไลซีน ซึ่งพบในสกุลคาทีลาโทสปอรา (*Catellatospora*) และโชวชิโอเพลน (*Chouchioplanes*)

เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) จะพบเปปติโดไกลแคนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid), อะลานีน (alanine) และ A_2pm ในอัตราส่วนเชิงขั้ว 1.0 : 1.3 : 0.9 (คำนวณจากปริมาณกรดกลูตามิก 1.0) ไอโซเมอร์ของ A_2pm เป็นแบบ *meso*-form เปปติโด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไกลแคนแบบ A₁gramma (Schleifer และ Kandler, 1972) ลักษณะของผนังเซลล์เป็นแบบ Type 3 (Lechevalier และ Lechevalier, 1970) หมู่ N-acetyl ของกรดกลูตามิกในเปปติโดไกลแคนเป็นหมู่อะซิทิล (Acetyl type)

ก. การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall)

ผนังเซลล์ทำหน้าที่ให้แบคทีเรียสามารถรูปร่างอยู่ได้ และช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตก เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกันสามารถดูได้จากชนิดของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ โดยวิเคราะห์ที่รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid isomer) ที่เป็นองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในผนังเซลล์

การที่มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกอยู่ เป็นข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับผนังเซลล์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งแอคติโนมัยซีท ถ้าแบคทีเรียแกรมบวกมีเปปติโดไกลแคนที่ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก 1 ตัว โดยกรดไดอะมิโนพิเมลิกส่วนใหญ่อยู่ในผนังเซลล์ ด้วยเหตุนี้ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในเปปติโดไกลแคนสามารถวิเคราะห์จากทั้งหมดในเซลล์ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในเปปติโดไกลแคนสามารถวิเคราะห์ได้จากทั้งหมดในเซลล์ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแยกได้โดยแผ่นโครมาโทกราฟี (paper chromatography) (Becker และคณะ, 1964) หรือแผ่นทดสอบเซลลูโลส (Staneck และ Roberts, 1974) Hasegawa และคณะ, 1983 รายงานว่าเป็นวิธีที่ง่าย และเข้าใจในการหากรดไดอะมิโนพิเมลิก

เมื่อพิจารณาลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในส่วนของผนังเซลล์ จึงสามารถจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ LL-Diaminopimelic acid และอีกกลุ่มที่ไม่ใช่ สเตรปโตมัยเซส (*Non-Streptomyces*) หรือแอคติโนมัยซีทที่หายากจะประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ meso-Diaminopimelic acid ได้แก่ เชื้ออื่นๆที่ไม่ใช่กลุ่มของสเตรปโตมัยเซส (*Non-Streptomyces*) รวมถึงเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell hydrolysate)

การหาลักษณะเคมีโทป์ของผนังเซลล์ (cell wall chemotypes) โดยน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จะมีรูปแบบของน้ำตาลในเชื้อแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยเชื้อสกุลไมโครสปอรา (*Microbispora*) จะพบน้ำตาลมาคูโรสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ในเซลล์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะประกอบไปด้วยสารบางอย่างที่มีลักษณะคล้ายกับน้ำตาลในส่วนของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) จะมีกลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมิวรามิก (muramic acid) โดย Lechevalier, 1970 เป็นผู้คิดค้นรูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ซึ่งส่วนประกอบของน้ำตาลที่แน่นอนซึ่งทำให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์น้ำตาลในแบคทีเรีย โดยปกติแล้วการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์จะใช้ในการแบ่งประเภทของแบคทีเรีย

ตารางที่ 2.3 แสดงรูปแบบของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

Pattern	Sugar				
	Arabinose	Fucose	Galactose	Madurose*	Xylose
A	+		+		
B				+	
C					
D	+		No diagnostic sugars		
E		+			+

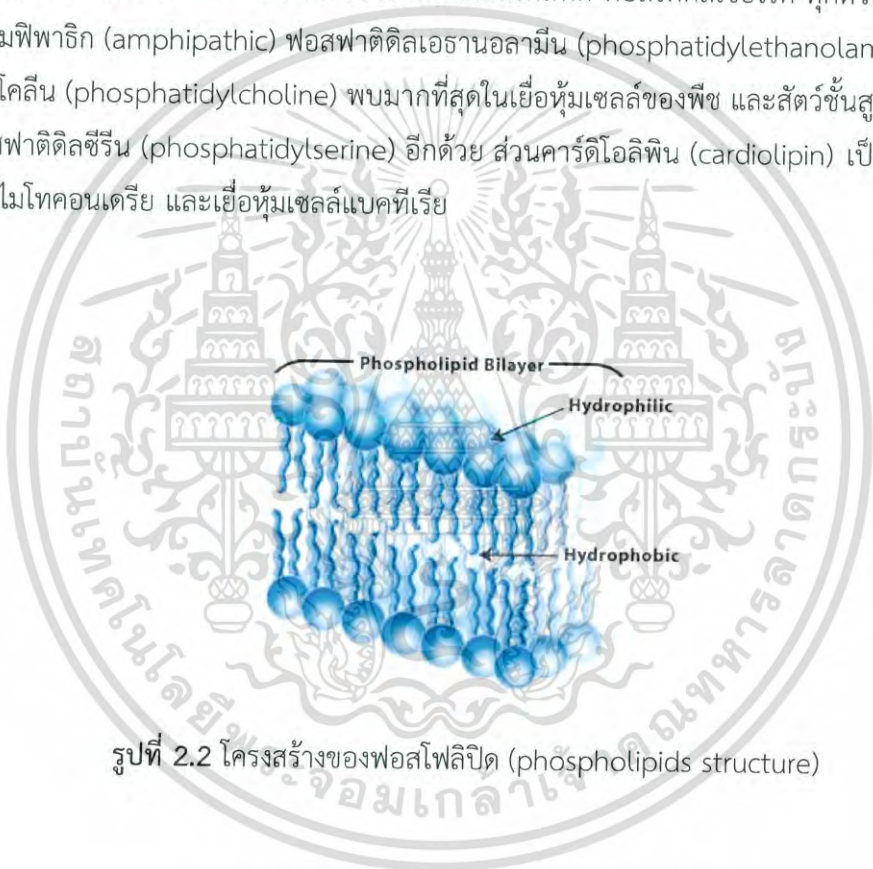
หมายเหตุ + คือ พบสารชนิดนี้ในเซลล์ *madurose หรือ 3-O-methyl-D-galactose

(ที่มา : จิตติ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. ฟอสโฟลิพิด (Phosphoglyceride)

ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) หรือฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride) หรือกลีเซอรอลฟอสฟาไทด์ (Glycerol Phosphatide) หรือกลีเซอโรฟอสโฟลิพิด (Glycerophospholipid) เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดฟอสโฟริก (H₃PO₄) กับหมู่ไฮดรอกซิล หนึ่งหมู่ของกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ กรดฟอสฟาติติก (phosphatidic acid) เป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ที่ง่ายที่สุด และพบในปริมาณน้อยมากในเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล และฟอสโฟลิพิด ฟอสโฟกลีเซอไรด์ ทุกตัวเป็นโพลาร์ลิพิด หรือแอมฟิพาธิก (amphipathic) ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) พบมากที่สุด ในเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช และสัตว์ชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบฟอสฟาติลซีรีน (phosphatidylserine) อีกด้วย ส่วนคาร์ดิโอลิพิน (cardiolipin) เป็นส่วนประกอบของเยื่อไมโทคอนเดรีย และเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด (phospholipids structure)

ฟอสโฟลิพิด เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และมีความสัมพันธ์ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ ลักษณะพิเศษของฟอสโฟลิพิดประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุล

พื้นฐานของฟอสโฟลิพิดดังแสดงในตารางที่ 2,4 นอกจากนี้ยังมีไกลโคลิพิด (glycolipids) (Shaw, 1970), ไลโปอะมิโน (Lipoamino acids) (Tahara และคณะ, 1976a, b) และ สปีนโกลิพิด (Sphingolipids) (Miyagawa และคณะ, 1978, 1979; Yamamodo และคณะ, 1978; Yomo และคณะ, 1982) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ชนิดฟอสโฟลิพิดโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อประโยชน์ทางวิชาการเท่านั้น เมื่อผู้ใดที่นำเอกสารฉบับนี้ไปใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอกติโนมัยซีท

Phospholipid type	PIMs	PI	PC	PG	PE	PME	GluNU	APG	DPG
I	+	+	-	V	-	-	-	V	V
II	+	+	-	V	+	-	-	V	+
III	V	+	+	V	V	+	-	V	V
IV	ND	+	-	-	V	V	+	-	+
V	ND	+	-	+	V	-	+	V	+

หมายเหตุ PIM คือ ฟอสฟาติลอีโนซิทอลแมโนไซด์ PI คือ ฟอสฟาติลอีโนซิทอล PC คือ ฟอสฟาติลโคลีน PG คือ ฟอสฟาติลกลีเซอรอล PE คือ ฟอสฟาติลเอทานอลามีน PME คือ ฟอสฟาติลเมทิลเอทานอลามีน GluNU คือ สารประกอบฟอสเฟสของกลูโคซามีน APG คือ อะดินิลฟอสฟาติลกลีเซอรอล DPG คือ ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล V คือ ไม่แน่นอน + คือ ตรวจพบ - คือ ตรวจไม่พบ

(ที่มา : จิตติ, 2547)

ง. ลักษณะของกรดไขมัน (Cellular fatty acids)

กรดไขมันเป็นสารประกอบสำคัญในเซลล์ไขมัน ซึ่งพบในกลุ่มของอาร์เคียแบคทีเรีย (archaeobacteria) ในบางชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างก๊าซมีเทน (Methanogenic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญได้ที่เข้มข้นของเกลือสูง (Halophilic bacteria) กรดไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ที่ตำแหน่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งประกอบด้วยลิพิดที่มีขั้ว (polar lipid) และไกลโคลิพิด (glycolipids) แบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปจะมีกรดไขมันหลายชนิดในเซลล์ที่สามารถควบคุมวิธีการสังเคราะห์ผลผลิตได้สูง (Lennarz, 1966) และอนุกรมวิธานของกรดไขมันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกประเภทของแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

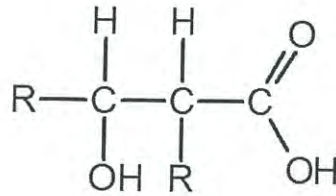
ตารางที่ 2.6 รูปแบบของกรดไขมันในเซลล์

Type	Saturate	Unsaturated	Iso-16	Iso-15/17	Anteiso 15/17	10-Methyl 17/18
1a	+++	+++	-	-	--	--
1b	++	++	-	-	-	++
2a	++	+	+++	+	(+)	--
2b	(+)	-	++	+++	+	- +
2c	++	(+)	+++	+	++	+++
2d	++	-	++	++	++	--
3a	++	++	+++	-	-	(+)++
3b	++	++	++	+++	+	-
3c	++	++	-	-	-	(+)++
	-	-	+++	+	+	+ -
3d	+++	+	+++	+++	+	+++

หมายเหตุ Saturate คือ ไขมันชนิดอิ่มตัว Unsaturated คือ ไขมันชนิดไม่อิ่มตัว Iso-16 คือ กรดไขมันรูปแบบที่มีไอโซบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 16 Iso-15/17 คือ กรดไขมันรูปแบบที่มีไอโซบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 15 และ 17 Anteiso15/17 คือ กรดไขมันรูปแบบที่ไม่มีไอโซบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 15 และ 17 + คือ ตรวจพบ - คือ ตรวจไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. กรดไมโคลิก (Mycolic acids)



Mycolic Acid

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดไมโคลิก

กรดไมโคลิก เป็นกรดไขมันที่มีโครงสร้างเป็นหมู่แอลคิล (alkyl) สายยาว ดังแสดงในรูปที่ 2.3 จำนวนคาร์บอนทั้งหมดของกรดไมโคลิกมีประมาณ 24-90 ตัว กรดไมโคลิกเป็นกรดไขมันที่พบในแบคทีเรียไมโครแบคทีเรีย (*Mycobacterium*) ในคาร์เดีย (*Nocardia*) โรโตค็อกคัส (*Rhodococcus*) โคลินีแบคทีเรีย (*Corynebacterium*) ซึ่งแบคทีเรียมีกรดไมโคลิกจะมีผนังเซลล์แบบชนิดที่ 4 มีโซ-ไดอะมิโนพิเมลิก แอซิด อะราบิโนส และกาแลคโทส (*meso*-diaminopimelic acid และ arabinose และ galactose) (Lechevalier, 1970) นอกจากนี้กรดไมโคลิกยังมีคุณสมบัติในการติดสี คือติดสีทนกรด (acid fastness) สูงหรือเรียกว่าแบคทีเรียติดสีทนกรด (Alshamaony และคณะ, 1977; Wada และคณะ, 1981) และในการวิเคราะห์กรดไมโคลิกสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกระดับตระกูล (genus) ของแบคทีเรียได้

กรดไมโคลิกพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียในชั้นผนังเซลล์ยังประกอบด้วยคอร์ดแฟกเตอร์ (cord factor) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เชื้อไมโครแบคทีเรีย (*Mycobacteria*) สามารถรวมกลุ่มกัน และเห็นลักษณะคล้ายฟันท่อนเมื่อตรวจทางจุลภาคซึ่งคอร์ดแฟกเตอร์ (cord factor) มีบทบาทในการก่อโรคโดยสามารถยับยั้งการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่ตำแหน่งติดเชื้อ และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกรานูโลมา (granuloma) ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังบนชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (พิมพ์, 2550) และใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้เชื้อไมโครแบคทีเรีย (*Mycobacteria*) ในส่วนของการทำงานของกรดไมโคลิกขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลในด้านโครงสร้างชีวสังเคราะห์ และสรีระวิทยาโดยเป็นพื้นฐานของการวิเคราะห์ถึงอนุกรมวิธานของกรดไมโคลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ. ไอโซพรีนอย ควิโนน (Isoprenoid quinones)

ไอโซพรีนอย ควิโนน (Isoprenoid quinones) มีหน้าที่สำคัญเป็นตัวเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในระบบการหายใจ ประเภทต่างๆของควิโนนพบได้ในเซลล์แบคทีเรีย ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศพบไอโซพรีนอย มีนาควิโนน และไอโซพรีนอยยูบิควิโนน ส่วนควิโนนประเภท เนปโทควิโนน (Naphthoquinones) มีคลอโรเบียมควิโนน ได้จากเชื้อ *Chlorobium thiosulphatophilum* (Redfeam และ Powls, 1968; Powls และคณะ, 1968) ดีเมทิลมีนาควิโนน จากบางสายพันธุ์ของสเตรปโตคอคโค (Streptococci) (Collins และ Jones, 1979) เมโทไอโนควิโนน จากเชื้อ *Hydrogenobacter thermophilum* (Ishii และคณะ, 1983; Kawasumi และคณะ, 1984) เมทิลมีนาควิโนน ได้จากบางสายพันธุ์ของแคมพิโลแบคทีเรีย (*Campylobacter*) (Carlone และ Anel, 1983) *Thermoplasma acidophilum* (Colin และ Langworthy, 1983) และ *Wolinella succinogenes* (Collins และ Fernandez, 1984) ส่วนควิโนนประเภทเบนโซควิโนน (Benzoquinones) ซึ่งประกอบด้วย โรโดควิโนนจากเชื้อ *Rhodospirillum rubrum* และการเพิ่มไฮโดรเจนในพันธะคู่ของไอโซพรีนิล ซึ่งมีประโยชน์ต่อระบบของแบคทีเรียด้วย

Yamada และคณะ(1976) รายงานว่าส่วนประกอบของไอโซพรีนอย ควิโนนเป็นส่วนคัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้ ชนิดของยูบิควิโนนมีประโยชน์ในการจำแนกในยีสต์เช่นกัน (Yamada และ Kendo, 1973; Yamada และคณะ, 1973, 1976)

Yamada และคณะ (1977) ได้ทำการศึกษาตำแหน่งการแทนที่หมู่ไฮโดรเจนในสายไอโซพรีนิลของมีนาควิโนน ในบางสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับสายพันธุ์ที่หลายของแบคทีเรีย จึงใช้เป็นข้อมูลสะสมในการศึกษาอนุกรมวิธานต่อไป

ในการวิเคราะห์หาไอโซพรีนอยควิโนนส่วนใหญ่เป็น มีนาควิโนน และยูบิควิโนน ใช้เครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) เป็นเครื่องวิเคราะห์หาควิโนน และยังมีการใช้เครื่อง HPLC และโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ซึ่งชนิดหลังนี้ช่วยวิเคราะห์หาควิโนนได้อย่างรวดเร็ว

มีนาควิโนน และยูบิควิโนนใช้คำย่อ $MK-n(H_m)$ และ $Q-n$ ตามลำดับ ซึ่ง n คือจำนวนหน่วยของไอโซพรีน และ m คือจำนวนอะตอมไฮโดรเจนในสายของไอโซพรีนิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ผนังเซลล์ชนิดเอซิล (Cell-wall acyl type)

ไกลแคน (glycan) ส่วนมากจะมีผนังเซลล์ที่เป็นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4 linkage เป็นที่ทราบกันว่าในแบคทีเรียบางชนิดมีหมู่ไกลโคซิล (glycosyl) ของกรดมิวรามิกจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิetyl (acetyl) (Adam และคณะ, 1969; Azuma และคณะ, 1970; Guinard และคณะ, 1970; Vilkas และคณะ, 1970) จึงได้มีการศึกษาชนิดของไกลโคซิล (glycosyl) ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และพบผนังเซลล์ชนิดไกลโคซิล (glycosyl) ในแอคติโนมัยซีทและแบคทีเรียโคลินีฟอร์ม (*coryneform*) บางชนิด ดังนั้นจึงได้ทำการพัฒนาวิธีการง่ายๆสำหรับการหาไกลโคซิลที่เหลือในเซลล์และได้เรียกวิธีการนี้ว่า เป็นการทดสอบไกลโคเลต (glycolate) (Uchida และ Aida, 1979, 1984) ได้เรียกเปปติโดไกลแคนรูปแบบนี้ว่าเป็นผนังเซลล์ชนิดเอซิล และมีการใช้ประโยชน์มากในการจำแนกประเภท และเป็นการบ่งชี้ถึงกลุ่มของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทและโคลินีฟอร์ม การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสามารถหาได้จากปริมาณของกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ซึ่งมีหน่วยเป็น n โมลต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Uchida และ Aida, 1977, 1979) อย่างไรก็ตามปริมาณของกรดไกลโคลิกจะมีน้อยกว่าที่ต้องการแต่สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ตามวิธีของ Uchida และ Aids, 1984

ข. องค์ประกอบกรดอะมิโนในเปปติโดไกลแคน

โครงสร้างเปปติโดไกลแคนไม่ได้พบเพียงสารประกอบของกรดอะมิโนสามารถวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบางหรือ HPLC การเตรียมเปปติโดไกลแคนจะประกอบด้วยเซลล์ที่แตก และตัวอย่างที่บริสุทธิ์ ขั้นตอนแรกของการเตรียมผนังเซลล์คือการทำให้เซลล์แตก และขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์คือ ต้องนำโปรตีน กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต และไขมันแยกออกจากตัวอย่าง

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีกล่าวโดยสรุปได้ดังนี้

1. มีรูปแบบของผนังเซลล์แบบที่ 3 (well chemotype III) คือผนังเซลล์มีกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) เป็นองค์ประกอบหลัก, กรดกลูตามิก (glutamic acid), กลูโคซามีน (glucosamine), กรดมีโซ-ไดอะมิโนพิเมลิก (meso-diaminopimelic acid) และกรดมิวรามิก (muramic acid)
2. ลักษณะของเปปติโดไกลแคนแบบ A_8 (peptidoglycan type A_8)
3. มีน้ำตาลมาดูโรส (madurose) เป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ (characteristic A_8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. มีรูปแบบของกรดไขมัน(fatty acid profile) แบบ 3c คือ ในเซลล์พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid), กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และกรดไขมันที่แตกกิ่งก้านทั้งแบบไอโซแอนโทไอโซ และกิ่งเมทิล (iso-anteiso- และ methyl-branched fatty acid)
5. มีเมนาควิโนนหลัก (predominant menaquinone) ชนิด MK-9
6. รูปแบบของฟอสโฟลิปิด แบบที่ 4 (phospholipids containing glucosamine) และอาจพบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติลเมทิลเอทานอลามีน (phosphatidylmethylethanolamine)

2.2.1.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท นิยมตรวจสอบลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene เป็นอาร์เอ็นเอที่มีเพียงชุดเดียวของจีโนมของแบคทีเรีย พบในแบคทีเรียทุกชนิดและในแอคติโนมัยซีท ยีนช่วงนี้มีขนาดประมาณ 1500 เบส 16S rRNA gene เป็นยีนเครื่องหมายที่ดีสำหรับการศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นยีนที่มีการอนุรักษ์ (Conserve gene) (เกษงา, 2550) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene การตรวจสอบยีนนี้มี 2 วิธีคือ PCP-RFLP และการหาลำดับเบส โดยการโคลนยีนด้วยไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 เบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นที่ตัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) และโปรแกรมตรวจวิเคราะห์หรือการนำชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสแล้วตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีน โดยใช้ Software สำหรับการตรวจวิเคราะห์ เช่น GCG Wisconsin Package, Gene Explorer หรือโปรแกรมที่ให้บริการผ่านทางอินเทอร์เน็ต เป็นต้น ก็จะสามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียที่เราต้องการตรวจสอบเป็นชนิดใด

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ในการออกแบบไพรเมอร์ ทำได้โดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank คัดลอกลำดับเบสของเชื้อที่เราต้องการตรวจสอบ (Genetics computer group, 1999) โดยนำมาแค่ส่วนที่เป็นลำดับเบสเก็บไว้ในข้อมูลอักษร (Notepad) จากนั้นใช้โปรแกรม Prime ใน GCG Wisconsin package ในการช่วยออกแบบไพรเมอร์จะได้ไพรเมอร์ต่างๆ หลากคู่ให้เลือกใช้ตามความต้องการ จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ทดสอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ถ้าไพรเมอร์ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงจะได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีนนี้เพียงแถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(เนื่องจากในจีโนมของแบคทีเรียมียีนนี้เพียงชุดเดียว) ขั้นตอนที่สำคัญคือ การใส่เงื่อนไขต่างๆก่อนการ ออกแบบไพรเมอร์ ยีนนี้มีความยาวประมาณ 1500 เบส และเพิ่มความจำเพาะของชิ้นส่วนที่จะได้โดยการ ใช้ไพรเมอร์หลายๆชุด(คู่) และเลือกชุดที่เหมาะสมสำหรับชิ้นนั้นๆ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอ (ผลผลิต ของพีซีอาร์) จะมีความชัดเจนควรมีเพียงแถบเดียว (การมีแถบดีเอ็นเออื่นๆ ขึ้นมาแม้ว่าจะมีขนาดโมเลกุล เล็กกว่า และมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็จะมีผลเสียมากในขั้นตอนการหาลำดับเบสของยีน เนื่องจากทำให้ ยากต่อการแยกยีนให้บริสุทธิ์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากการทดสอบแล้ว จึงเริ่ม การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ Genomic DNA ของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบต่อไป อาจตรวจสอบไพรเมอร์ไป พร้อมๆกับการโคลนยีนได้ ซึ่งมีหลายวิธีในการกำหนดเงื่อนไขของพีซีอาร์ (PCR Protocol)

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ที่เป็นผลจากการทำพีซีอาร์ การหาลำดับเบสสามารถทำได้โดยวิธี Automated DNA Sequence คือ การหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ มี หลักการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในธรรมชาติอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสคู่สม (complementary base) กับ ดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดี เอ็นเอโดยวิธี cycle sequencing ซึ่งจะต้องใช้ร่วมกับเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) สำหรับแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอบนวันที่เรียกว่า Slab gel ค่าที่อ่านได้จะมีความละเอียดสามารถแยก ขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้พัฒนาเป็นระบบ capillary electrophoresis ซึ่งจะลดขั้นตอนการเตรียมแผ่นวันที่ให้ใช้งานได้สะดวก และแม่นยำขึ้นสามารถ รองรับงานวิจัยด้านจีโนมของสิ่งมีชีวิตและงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆได้มาก

วิธีการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) เป็นวิธี หนึ่งที่ยอมรับและได้รับการยอมรับสำหรับการใช้อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ไม่ทราบชนิดเทียบกับ type strain เช่นกรณีเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ร้อยละการจับกันของดีเอ็นเอเท่ากับร้อยละ 70 ขึ้นไปแสดงว่าเชื้อ ทั้ง 2 ชนิดเป็นเชื้อเดียวกัน โดยทั่วไปวิธีการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันในดีเอ็นเอจะใช้สารโฟโตไบโอติน (Photobiotin) เป็นตัวติดฉลากดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงจึงเรียก วิธีการนี้ว่า photobiotin labeling DNA-DNA hybridization หรืออาจใช้อีกวิธีคือการนำดีเอ็นเอที่ ต้องการตรวจสอบแยกให้เป็นสายเดี่ยวแล้วยึดบนไนโตรเซลลูโลสหรือแผ่นไนลอน สารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ ต้องปราศจากเอนไซม์ S1 nuclease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงแบบเขย่า ส่วนใหญ่มักเจริญแบบที่เส้นใยอันแน่นเป็นเม็ดกลมๆ (pellet) โดยเฉพาะเชื้อสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ซึ่งจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่อาจมีลักษณะเม็ดกลมๆ (pellet) ที่เกิดขึ้นจะจำกัดการขนถ่ายมวลสาร (mass transfer) และทำให้เกิด solute gradient ขึ้นภายใน เม็ดกลมๆ (pellet) เซลล์ที่อยู่ในส่วนกลางจะถูกจำกัดธาตุอาหาร และเมื่อเม็ดกลมๆ (pellet) เพิ่มขนาดใหญ่ การเจริญจึงเกิดเฉพาะส่วนพื้นที่ผิวภายนอกเท่านั้น

2.2.2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. แหล่งคาร์บอน (carbon source)

โดยทั่วไปกลูโคสคือแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ขณะเดียวกันกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon metabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin, 1980) นอกจากกลูโคสแล้วยังมีมอลโตส (maltose) กลีเซอรอล (glycerol) และแป้งที่มีรายงานว่าใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ในการผลิต Hikizimycin ใช้มอลโตสร้อยละ 3 และกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Uchida และคณะ, 1971) ในการผลิต Neo-enacin ใช้ soluble starch ร้อยละ 1.5 และกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Kenso และคณะ, 1979) ในการผลิต Aabamycin ใช้กลีเซอรอลร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ในการทดลองของดาร์รัตน์ รอดพยาร์ พบว่าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา (ดาร์รัตน์, 2525)

ข. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนมีผลอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Ahoronowitz, 1980) โดยทั่วไปนิยมใช้ถั่วเหลืองบด (soybean meal) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารปฏิชีวนะ

Kanoksilapatham (1981) รายงานถึงการใช้ถั่วเหลืองบดละเอียดเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยในอาหารที่ใช้ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะจากสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) จะให้ผลดีกว่าอาหารที่ใส่ลงในเปปโตน และ meat extract เมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาโซเดียมไนเตรทมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต temenimycin (Shimi และคณะ, 1971)

ค. อนินทรีย์ฟอสเฟต (Inorganic phosphate)

ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจน และกระบวนการหายใจเป็นผลให้การเจริญเติบโต แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง โดยทั่วไปความเข้มข้นของฟอสเฟตประมาณ 0.3-300 มิลลิโมล ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสนับสนุนการเจริญของเชื้อตั้งแต่ 10 มิลลิโมล จึงเหมาะสำหรับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Martin, 1977) เมื่อมีความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารสูง พบว่านอกจากจะขัดขวางการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะแล้วยังยับยั้งการเจริญด้วย (Liu และคณะ, 1975)

ง. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts)

สำหรับเกลืออนินทรีย์ที่นิยมใช้กันทั่วไปเพื่อเริ่มการผลิตสารปฏิชีวนะคือ โซเดียมคลอไรด์ การผลิตสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) โดย *Streptomyces griseus* จะเพิ่มขึ้นถ้าเติมสารโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเติมในปริมาณสูงจะยับยั้งการผลิต

จ. โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals)

โลหะหลายชนิดจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็น Cofactor ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ได้แก่ V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn และ Mo สำหรับ Mn, Fe และ Zn มักจะมีบทบาทในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Weinberg, 1962, 1970) ซึ่งความต้องการโลหะนั้นอยู่ในปริมาณน้อยมาก และปริมาณโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญจะต่างกัน ความต้องการสำหรับกระบวนการผลิตจะมากกว่าความต้องการสำหรับการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า (Iwai และ Omura, 1982)

ฉ. สารตั้งต้น (precursors)

การผลิตเพนิซิลิน-จี (penicillin G) ในปริมาณสูงโดยใช้เชื้อ *Penicillium chrysogenum* จะเกิดขึ้นโดยการเติมฟีนิลอะซิเตท (phenylacetate) เป็นสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ และการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในสิ่งมีชีวิตจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่ำ ด้วยเหตุนี้เมื่อเติม analogs เป็นสารตั้งต้น ในบางครั้งจะมีการใช้สารตั้งต้นนี้ทำให้เกิดผลผลิตชนิดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สารทุติยภูมิจากเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุลไมโครสปอรา (*Microbispora*)

แอกติโนมัยซีทเป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่มใหญ่ที่ได้สำรวจ และพบว่าจีสสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) นี้เป็นกลุ่มจีสที่สามารสรสร้างสารปฏิชีวนะได้ในจำนวนมาก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาหาสารปฏิชีวนะ (Okami และ Hotta, 1988) สารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อสกุลจีสสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) พบมากถึงร้อยละ 90 ของจำนวนแอกติโนมัยซีททั้งหมด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างได้มีหลายประเภท ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลิน (Ampicillin) และเพนิซิลิน-เอ็น (Penicillin-N) สารต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ ไนสแตติน (Nystatin) พอลิออกซิน (Polyoxin) และแอนทราไซคลิน (Anthracycline) เป็นต้น

สำหรับเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) นั้นพบว่าสามารถสร้างสารโปรเปปติน (Propeptin) ภายในโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ตัว เชื่อมต่อกันเป็นวงระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 9 และ 10 โปรเปปตินมีคุณสมบัติเป็น Prolyl endopeptidase inhibitor สร้างได้จากเชื้อ *Microbispora* sp. SNA-115 นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ *Microbispora rosea* จะพบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเพปไทด์เช่นกัน และบางสายพันธุ์จะพบการสร้างผลึกสีม่วง (iodinine) บนอาหารเลี้ยงด้วย (Hayakawa และคณะ, 1991)

2.2.4 ประโยชน์ของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

เชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทถือว่ามีค่าสำคัญซึ่งรวมถึงเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ พบว่าเชื้อมักมีการสร้างสารทุติยภูมิขึ้นในช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) และช่วงต้นของระยะคงที่ (Stationary phase) ของการเจริญ ซึ่งสารที่สร้างนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ ถือว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด พบว่าเชื้อกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะได้นั้นมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันออกเป็นแฟมิลี (Family) หรือลำดับ (Series) ได้ประโยชน์ของเชื้อไมโครไบสปอรานั้นยังมีการศึกษาน้อย อาจเนื่องจากเชื้อสกุลนี้มีการกระจายตัวไม่มากในแหล่งธรรมชาติ เมื่อเทียบกับเชื้อสกุลอื่น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอราสามารถสร้างเอนไซม์ไพรูเวทฟอสเฟตไคเนส (pyruvate phosphate dikinase; PPDk) (Eisaki และคณะ, 1999) จากเชื้อไมโครไบสปอรา โรซีเอ (*Microbispora rosea*) subsp. *aerate* เอนไซม์ไพรูเวทฟอสเฟตไคเนสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน APM PPI และฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenolpyruvate) ไปเป็นสารพลังงานสูง และไพรูเวท (Pyruvate) เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งได้ศึกษาการโคลนยีน *egh-A* จากเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ยีนนี้ทำหน้าที่ถอด และแปลรหัสให้เอนไซม์ 1,4-บีตา-กลู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคนกลูโคไฮโดรเลส (1,4-beta-glucan glucohydrolase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม และ เกษตรกรรม (Kimura และ Yoshihama, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆอีก เช่น การนำไปใช้เป็นสารช่วยในการสกัดสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate; PHA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นชีวพลาสติก (bioplastic) จากเชื้อไซโนโรโซเปียม ปิริโรติ (Sinorhizobium meliloti) พบว่าเมื่อนำเซลล์ของไซโนโรโซเปียม ปิริโรติ (Sinorhizobium meliloti) ที่สามารถสร้างสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมาต้มที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ที่ได้เติมหัวเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) มีส่วนช่วยในการสกัดสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเซลล์ของ ไซโนโรโซเปียม ปิริโรติ (Sinorhizobium meliloti) ได้ (Lakshman, 2006) ไมโครไบสปอรา โรซีเอ (Microbispora rosea) จัดเป็นผู้ผลิตเอนไซม์ดี-ไซโลส ไอโซเมอเรส (D-xylose isomerase) ขึ้นเยี่ยมเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) เป็นดี-ฟรุกโตส (D-fructose) ในระดับอุตสาหกรรม (Crueger, 1982) นอกจากนี้เชื้อกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic microbispore) ยังสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลาย และเปลี่ยนแปลงสารพวกเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) เช่น เซลลูโลส (cellulose) ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้ดี จึงสามารถนำมาผลอตน้ำตาลจากของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ (Waldron, 1986) สำหรับเชื้อไมโครไบสปอรา ไบสปอรา (Microbispora bispora) ได้มีรายงานว่าสามารถผลอตเอนไซม์เอนโดกลูแคนเนส (endoglucannase) เอนไซม์เอกโซกลูแคนเนส (exoglucannase) (Bartley และ Eveleigh, 1984) เอนไซม์อัลฟา-แอล-อะราบินโนฟูราโนซิเดส (α -L-arabinofuranosidase) เอนไซม์เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase; 1,4- β -D-xylanase) และเอนไซม์ บีต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย (Ball และ McCarthy, 1988)

2.3 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่หรือประมาณ 3 ใน 4 ของทั้งหมดที่มีอยู่ในดินมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่ผลิตขึ้นมา ได้แก่ สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol), คลอเตตราไซคลิน (chlortetracycline), ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracyclin) และ ไซโคลเฮกซิมายด์ (cycloheximide) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารทุติยภูมินอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารได้อีกหลายชนิด เช่น สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช สารต่อต้านมะเร็ง และสารกดภูมิคุ้มกันได้ จากข้อมูลพบว่า สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างขึ้นมาจากแอคติโนมัยซีท เชื้อรา และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Seong-Hwan Kim และคณะ.,2011

ทำการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท *Streptomyces* sp. SNA015 ที่อาศัยร่วมกับตัวงมุลสัตว์ โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่าง การแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ SNA015 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rDNA, เพิ่มปริมาณยีน และหาลาดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า *Streptomyces* sp. SNA015 การเลี้ยงเชื้อในอาหาร YPM2 และการสกัดสารด้วย ethyl acetate การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ ตลอดจนการเลี้ยงเซลล์และทดสอบกับสาร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารฟีนิลไพริดีน ชนิด Coprismycin A และ B ได้ซึ่งมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทโดปามีน และเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น 80.3% 80% 83.3% และ 88.4% ตามลำดับ

Mia Y. Summers และคณะ.,2006

ทำการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจาก *Streptomyces* sp. LL-C31037 ที่อยู่ในดินพบว่าสาร 3-Normeridamycin ที่ได้จากการหมักสารสกัดจากดินที่มี Actinomycete *Streptomyces* sp. LL-C31037 มีศักยภาพการปกป้องเซลล์ประสาท เมื่อนำมาทดสอบกับสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทอย่าง 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) พบว่า 3-Normeridamycin สามารถฟื้นฟูการทำงานในการดูดซึม Dopamine ได้ในเซลล์ประสาทชนิด Dopaminergic neurons ที่ค่า EC_{50} เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 110 nM

Eftekharzadeh B และคณะ.,2010

ทำการศึกษาการยับยั้งภาวะออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ก่อให้เกิดแอมิโลยด์เบต้า ในเซลล์ประสาท จากผลการศึกษาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งแอมิโลยด์เบต้าในเซลล์ประสาท NT2 ที่พบได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย Actinomycetes ที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินโดยเลือกใช้การจัดจำแนกโดยใช้อนุกรมวิธานแบบโพลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces antibioticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xiachang Wang และคณะ.,2015

ทำการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท จากเชื้อ *Streptomyces* sp. RM-5-8 พบว่า สาร Terfestatins B และ C ซึ่งเป็นสาร p-Terphenyl Glycosides ชนิดใหม่ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. RM-5-8 มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากแอลกอฮอล์ โดยใช้เซลล์ rat hippocampal ในการทดสอบ

Won-Gon Kim และคณะ.,2001

ทำการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท N18-RE-105 ต่อความเป็นพิษของกลูตาเมต โดย Benzastatins H และ I พบว่าสามารถป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษของกลูตาเมตได้ที่ค่า EC_{50} เท่ากับ 30.3 and 21.6 μM ตามลำดับ สามารถช่วยปกป้องสมองจากอนุมูลอิสระเป็น positive control พบว่าค่า EC_{50} เท่ากับ 0.7 μM ซึ่ง Benzastatins H และ I ไม่แสดงความเป็นพิษที่ 200 μM



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- | | |
|--|---|
| 3.1. .1เครื่องเขย่าสารแนวราบ)Shaker Incubator) | GALLENKAMP: 5693 |
| 3.1. .2เครื่องระเหยชนิดสูญญากาศ)Rotary Evaporator) | |
| 3.1. .3ตู้ปลอดเชื้อ)Laminar Airflow) | HOLTEN |
| 3.1. .4หม้อนึ่งความดันไอ) Autoclave) | HIRAYAMA รุ่น HA-300
MIV |
| 3.1. .5กรวยแยก)Separatory funnel) | |
| 3.1. .6กรวยกรอง)Glass funnel) | |
| 3.1. .7ตะเกียงแอลกอฮอล์)Alcohol Bunner) | |
| 3.1..8เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง | รุ่น BA 610 บริษัท
Sartorius Germany |
| 3.1.9. เครื่องวัดค่าพีเอช(pH meter) | EUTECH INSTUMENT
P4510 ,USA |
| 3.1.10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง(Bright field Microscope) | OLYMPUS |
| 3.1.11. เต้าไมโครเวฟ | SUMSUNG รุ่น 1913 |

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1 Yeast extract – malt extract broth (ISP2)
- 3.2.2 Oatmeal agar (ISP3)
- 3.2.3 Inorganic salts – starch agar (ISP4)
- 3.2.4 Glycerol – asparagine agar (ISP5)
- 3.2.5 Peptone – yeast extract iron agar (ISP6)
- 3.2.6 Tyrosine agar (ISP7)
- 3.2.7 Trace salts solution
- 3.2.8 Czapek’s sucrose agar (Difco)
- 3.2.9 Nutrient agar (Difco)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 กลูโคส (Glucose)
- 3.3.2 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- 3.3.3 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
- 3.3.4 วุ้น (Agar)
- 3.3.5 โอ๊ตมีลล์ (Oatmeal)
- 3.3.6 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
- 3.3.7 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.8 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.3.9 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
- 3.3.10 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
- 3.3.11 แอสพาราจีน (L - asparagine)
- 3.3.12 ก्लीเซอรอล (Glycerol)
- 3.3.13 เปปโตนไอรอนเอการ์ (Peptone iron agar)
- 3.3.14 แอลไทโรซีน (L-tyrosine)
- 3.3.15 ไอออนซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.16 แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)
- 3.3.17 ซิงค์ซัลไฟด์ ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.18 แอสพาราจีน (Asparagine)
- 3.3.19 ซูโครส (Sucrose)
- 3.3.20 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)
- 3.3.21 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 3.3.22 สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract)
- 3.3.23 เปปโตน (Peptone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. 4 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp.

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

3.4.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทลงในอาหาร ยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (ISP2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ถึง 28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ ตรวจสอบลักษณะสปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า ทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลตที่น่าสนใจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

3.4.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลตที่สนใจโดยการเลี้ยงลงบนอาหารกลูโคส แอสพาราจีน เอการ์ (glucose asparagines agar) (ภาคผนวก ก) อาหารนิวเทรียนท์ เอการ์ (nutrient agar) (ภาคผนวก ก) อาหารซา (Czapek's agar) และอาหารต่างๆ ตาม International Streptomyces Project (ISP) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract – malt extract agar, ISP2) อาหารโอทมีท เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) (ภาคผนวก ก) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salts – 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) โดยทำการเชื้อเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ สีและเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system) (Kelly, 1964)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype)

นำลำดับนิวคลีโอไทป์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ที่ได้จาก รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ มาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) โดยทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล EXtaton นำข้อมูลลำดับเบสมารวมกัน โดยใช้โปรแกรม Bioedit เพื่อตัดช่องว่างในสายดีเอ็นเอ และจำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.7 package (www0megasoftware.net/) (Yukphan et al., 2006)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

3.5.1 การหมักเชื้อเพื่อให้ผลิตสารและการสกัดสาร

นำเชื้อไมโครโสปอรามาเลี้ยงในอาหารเหลวยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์ เอ็กแทรกท์ (yeast extract – malt extract broth) ปริมาตร 150 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน นำน้ำหมักเชื้อที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยากที่ได้ส่งไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องประสาทที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องค์กรักษ์

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทพีลิบแก้ว

เซลล์พีลิบแก้วจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NBCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

3.5.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์พีลิบแก้วเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทพีลิบแก้ว

นำเซลล์พีลิบแก้วที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา 2×10^6 cells/mL เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ 0.5 μ M all *trans*-retinoic acid (RA) ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการ เปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยไปเปต แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิว ภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออกปล่อยให้แห้งภายใต้ รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 7×10^4 cells/mL (150 $\mu\text{L}/\text{well}$ สำหรับ 96-well plate และ 1.5 mL/well สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเป็น α -MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน บรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้น ทำการเติม 10 μM cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทชนิดโคลิเนอร์จิก ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

3.5.2.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท รวมทั้งเพื่อหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทำการทดสอบดังนี้

นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วย 10% DMSO/ H_2O เพื่อเตรียมความเข้มข้น 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO

นำสารละลายที่เตรียมขึ้น มาทดสอบกับเซลล์ประสาทพีสิปแก้ว แล้วบ่มเซลล์ที่ 37°C ในบรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท ด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมและกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มควบคุมคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ ($n = 3$, triplicate) และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทกลุ่มตัวทำละลายควบคุมจะต้องมีอัตราการรอดชีวิต อยู่ในช่วง $100 \pm 5\%$ จึงจะยอมรับว่าตัวทำละลายไม่มี ผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

นำเอาสารทดสอบที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่า 100% ที่ความเข้มข้น 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มาทดสอบ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดสภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation คือการเพาะเลี้ยง เซลล์ประสาทในอาหารที่ไม่มีการเติมซีรัม การทดสอบทำได้โดยการเติมสารละลายสารทดสอบในความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น $0.02 \mu\text{g/mL}$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัม ซึ่งจะให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ $0.001 \mu\text{g/mL}$ และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย XTT reduction assay โดยกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (กลุ่มควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100% และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัมและมีตัวทำละลายเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ ($n = 3$, triplicate) และใช้ 1 nM quercetin เป็น positive control

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัมและไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสกุลไมโครไบสพอรา การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ ซึ่งการเก็บผลทดลองเลือกใช้อาหาร ISP2 เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบเจริญและสีโคโลนีของเชื้อเนื่องจากเป็นอาหารที่เชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญเติบโตได้ดีที่สุด, ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ (ภาคผนวก ค)

จากการนำเชื้อไมโครไบสพอราที่สร้างสปอร์ที่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ ได้แก่ ไอโซเลต AN2-5, BR3-3, CL1-1, CL2-2, CS-R-4, KE1-2, KE1-3, KE2-2, KE2-4, KE2-5, KK1-10, KK1-11, KM1-1, KM1-2, ZO1-7, ZZ-H-4, ZZ1-4 และ ZZ2-2 มาดูทำการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ จากผลการศึกษาเชื้อไมโครไบสพอรา มีรายละเอียดดังนี้

(1) เชื้อไอโซเลต AN2-5

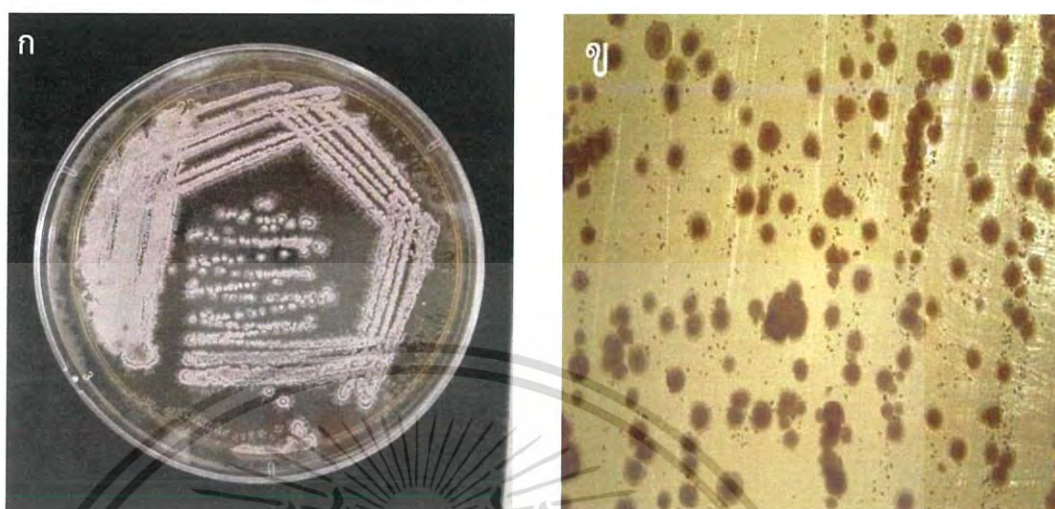
ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต AN2-5 สร้างสปอร์ที่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.1 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีค่อนข้างเหลืองอมน้ำตาล (strong yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้มอมเหลือง (deep orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.1 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.0-7.2 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต AN2-5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 53 (รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



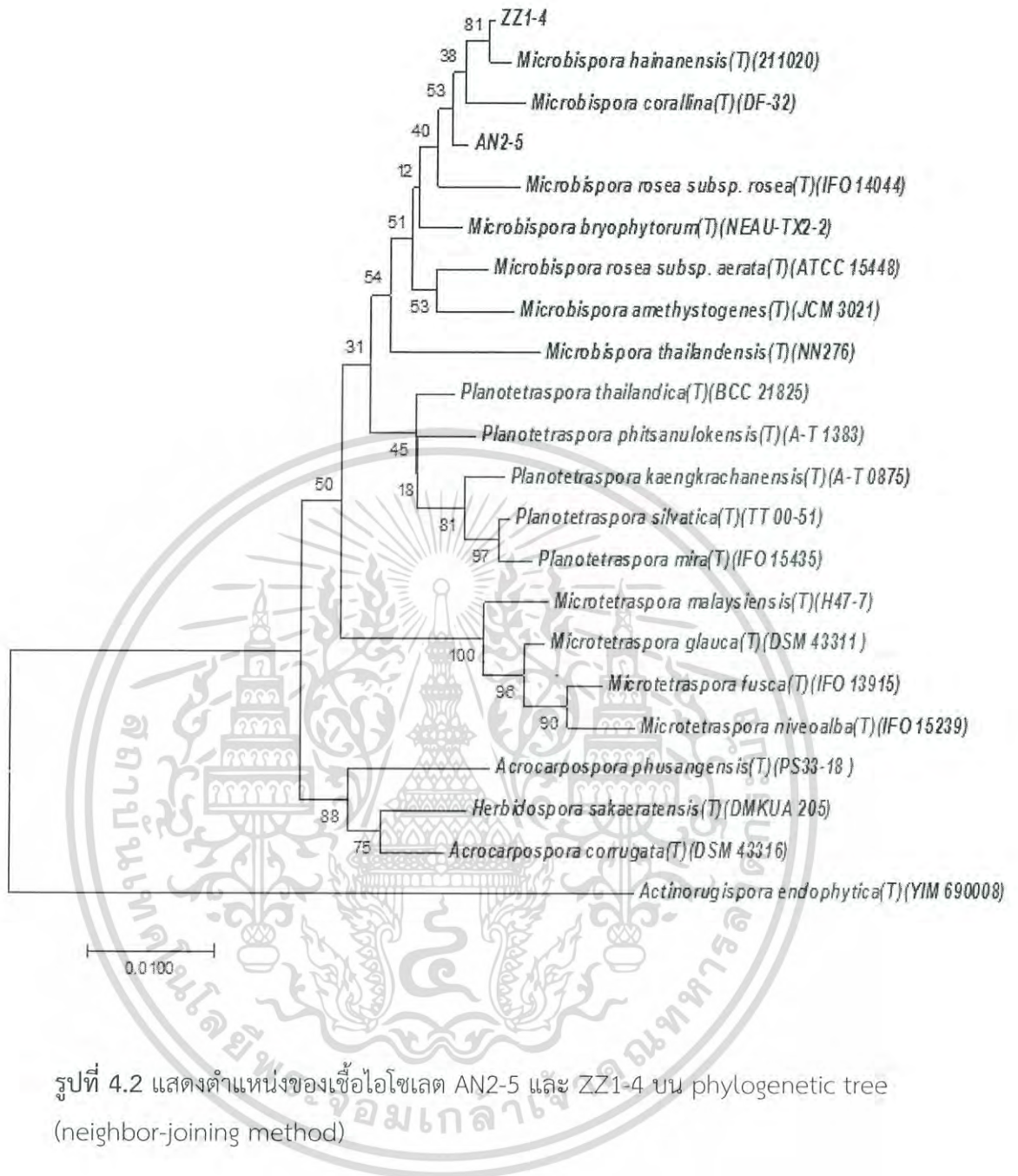
รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AN2-5

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) เชื้อไอโซเลต BR3-3

ลักษณะทางฟีโนไทป์

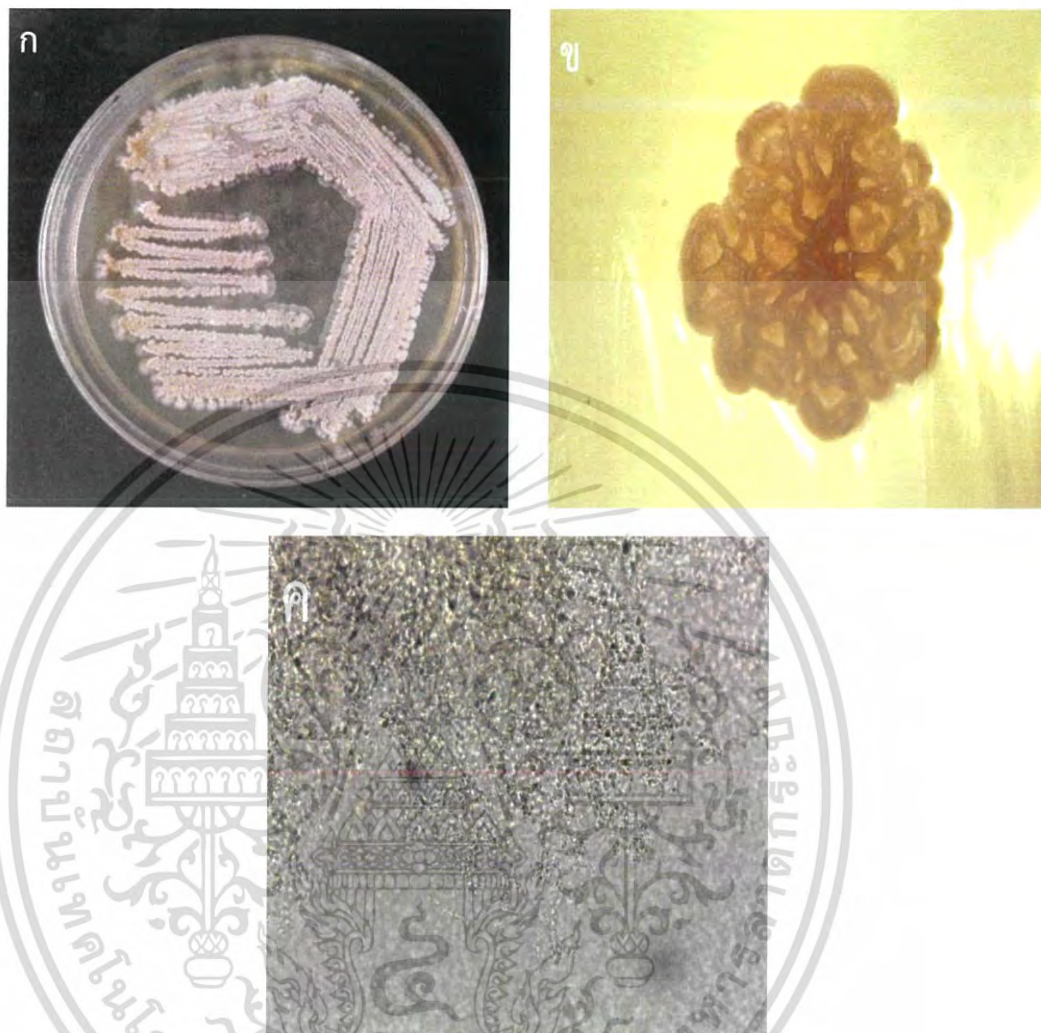
เชื้อไอโซเลต BR3-3 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.3 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้มอมเหลือง (strong orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มทึบอมเหลือง (dark orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.3 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหารเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.0-7.2 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครโอบสปอราไอโซเลต BR3-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.4)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



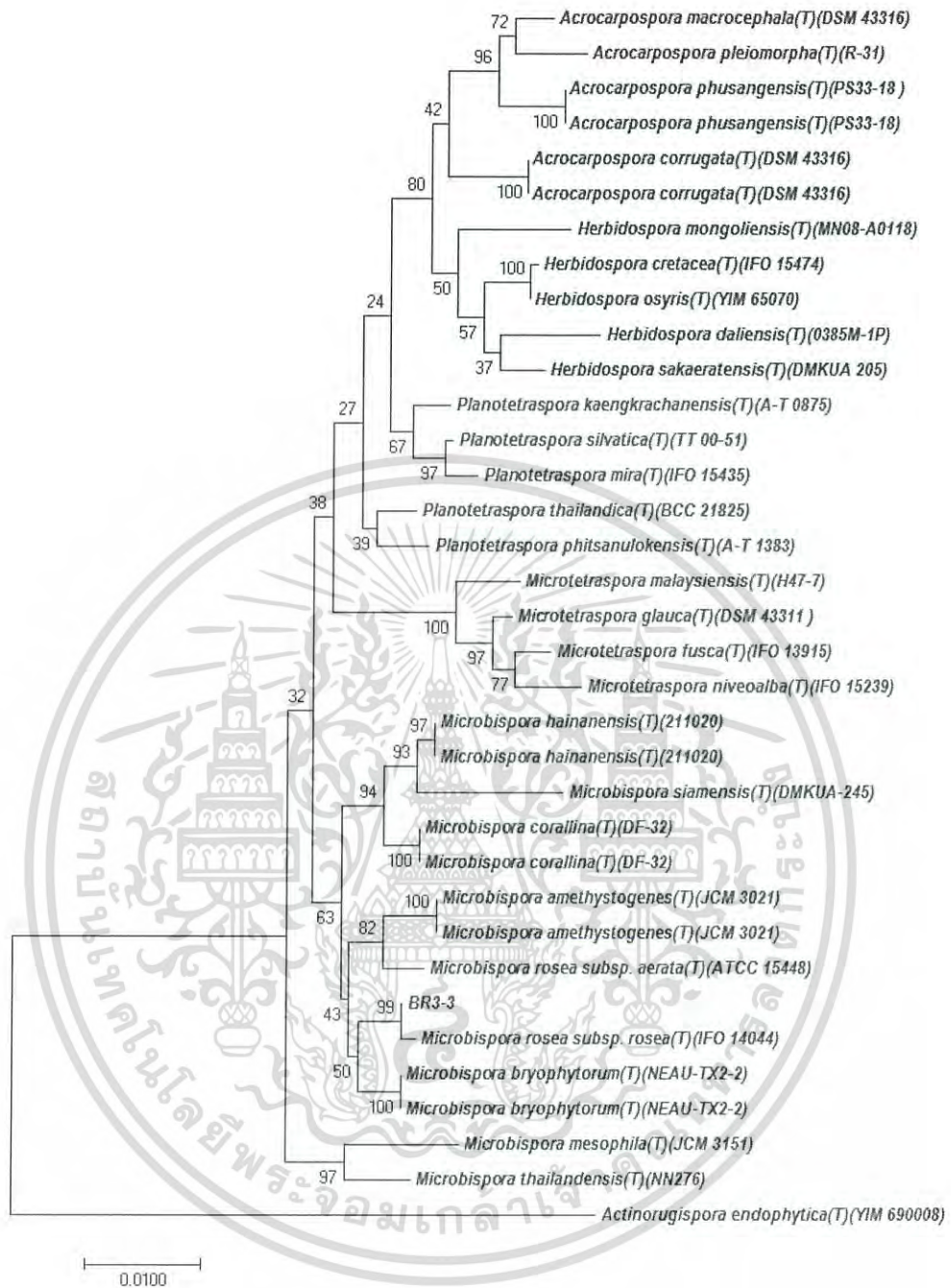
รูปที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BR3-3

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) เชื้อไอโซเลต CL1-1

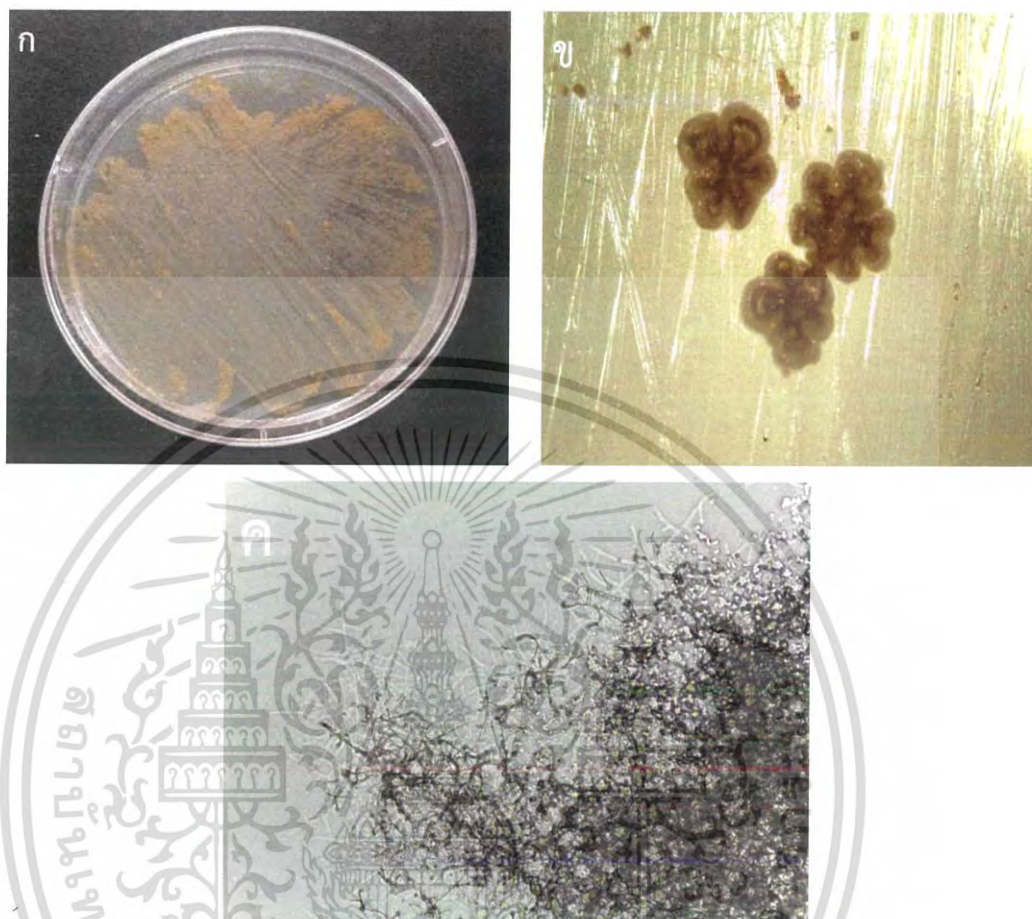
ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต CL1-1 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.5 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม (strong yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้มอมเหลือง (strong orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.5 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต CL1-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 67 (รูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

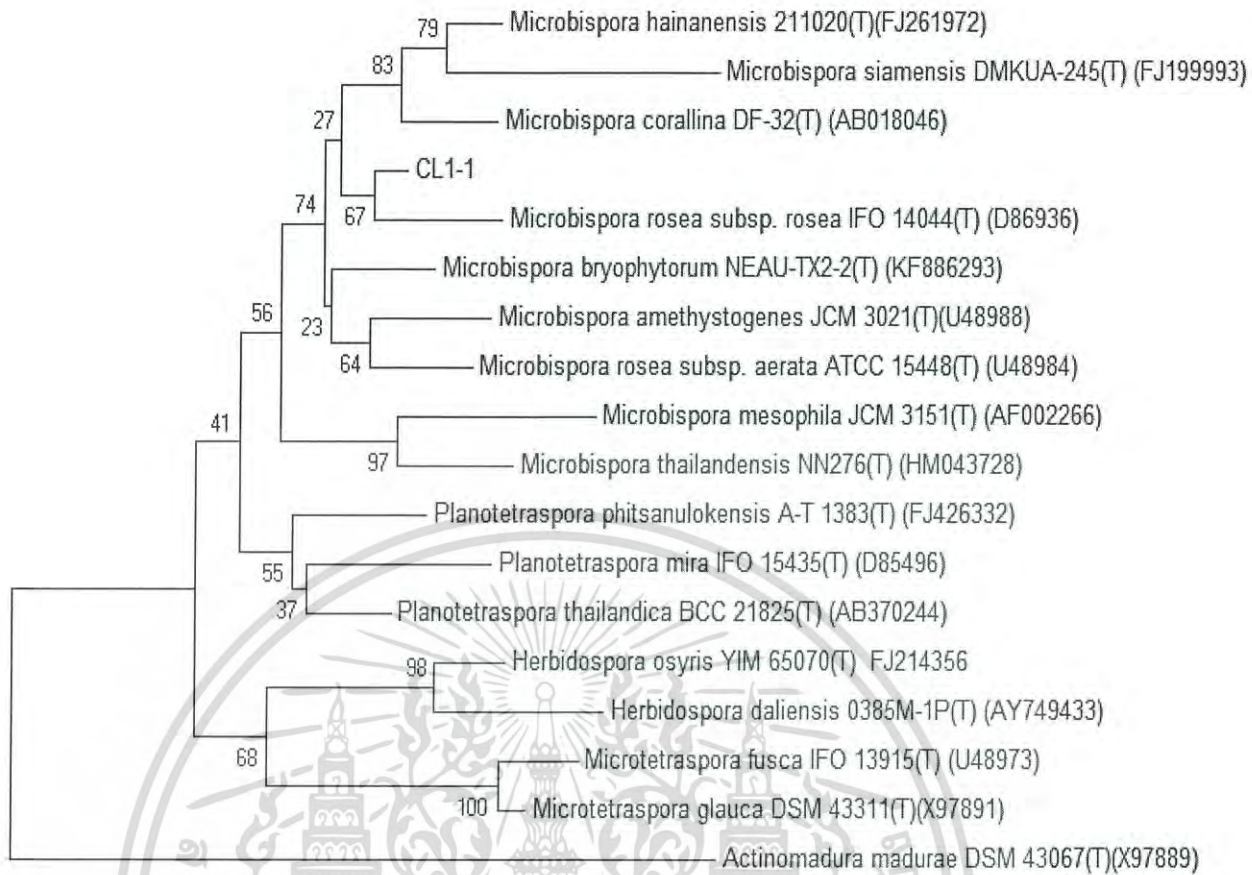


รูปที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL1-1

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) เชื้อไอโซเลต CL2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

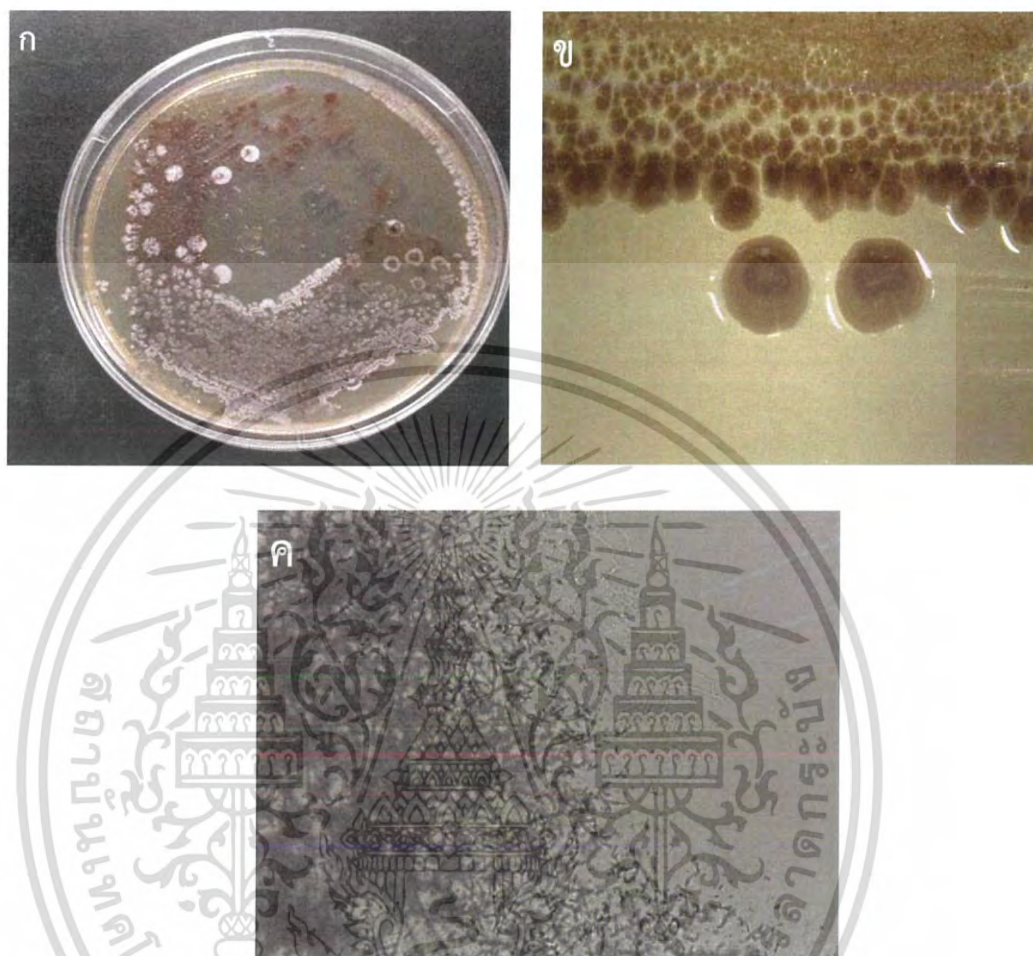
เชื้อไอโซเลต CL2-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.7 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มที่บอมเหลือง (deep orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองทึบ (deep yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.7 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.2-7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครโอบสปอราไอโซเลต CL2-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 66 (รูปที่ 4.8)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



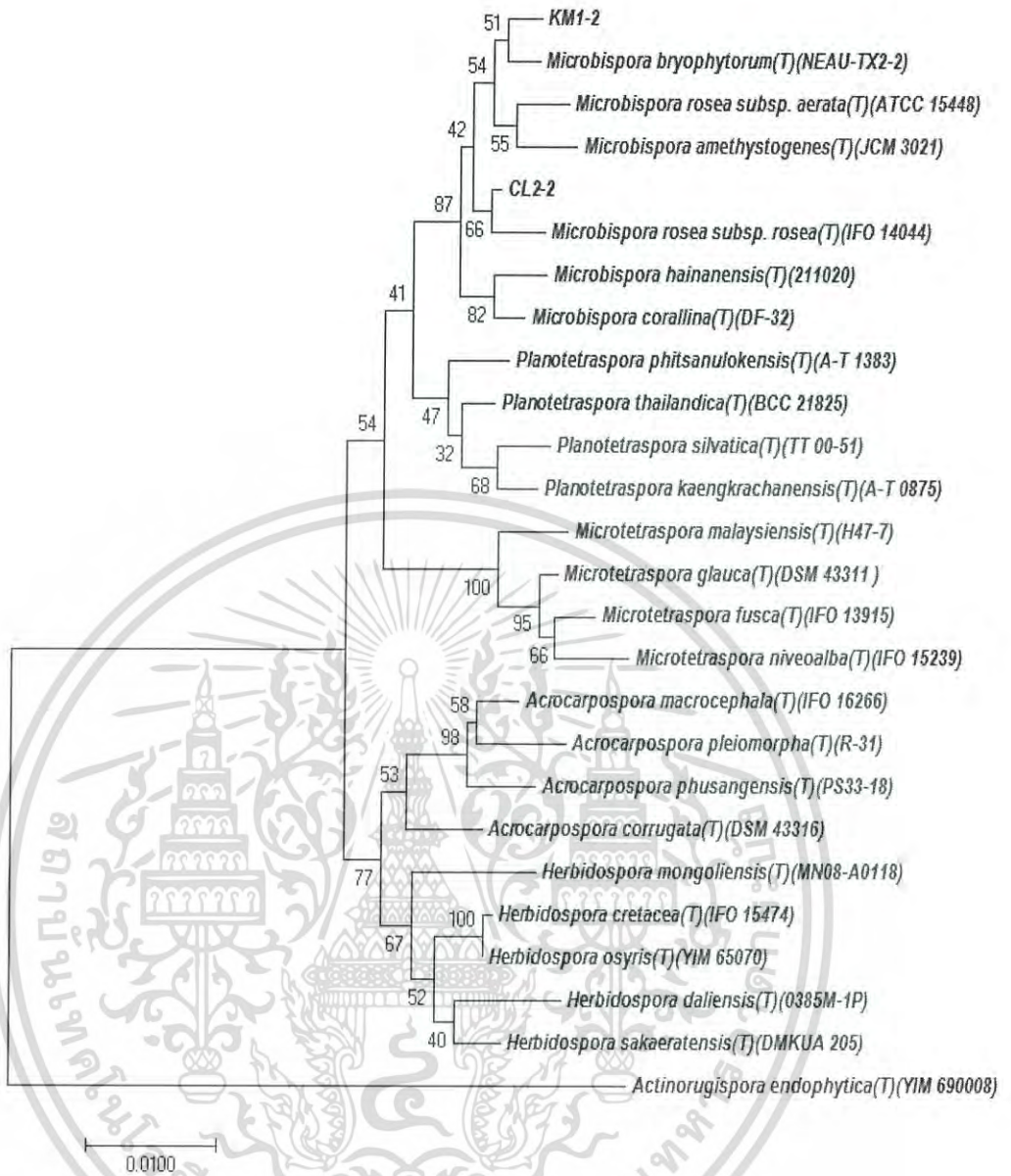
รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL2-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



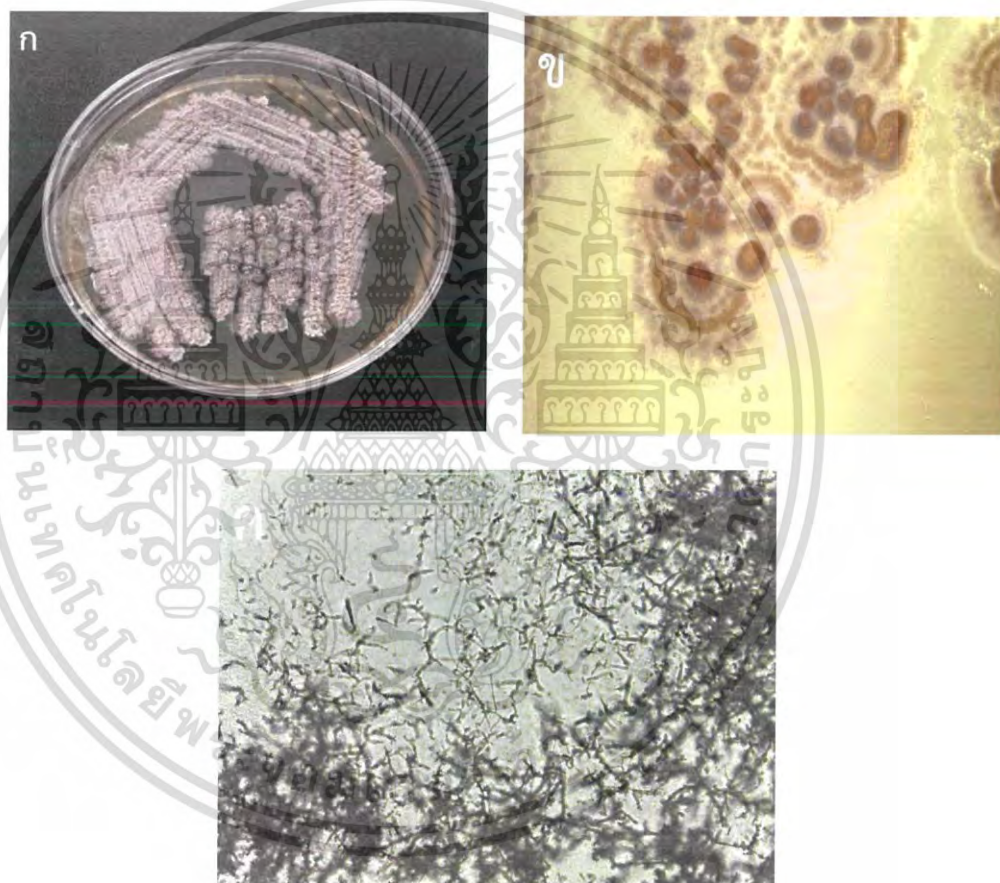
รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL2-2 และ KM1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(5) เชื้อไอโซเลต CS-R-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต CS-R-4 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.9 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเหลือง (vivid orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองเข้ม (strong yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.9 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลาย เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CS-R-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(6) เชื้อไอโซเลต KE1-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

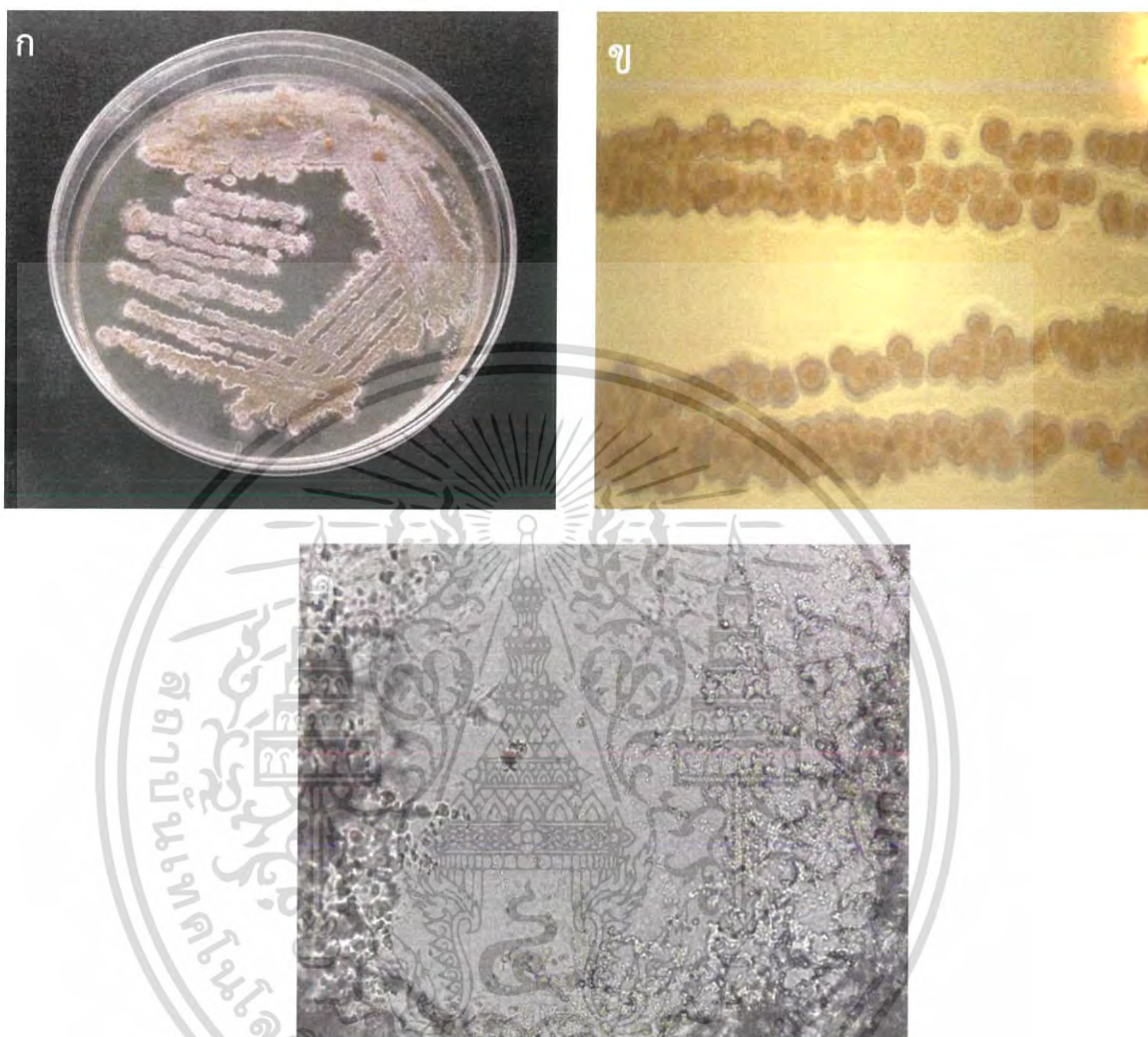
เชื้อไอโซเลต KE1-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4. ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอ่อนอมเหลือง (moderate orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้ม (strong orange) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.10 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างอยู่ที่ 7.2-7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครโอบสปอราไอโซเลต KE1-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 97 (รูปที่ 4.11)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



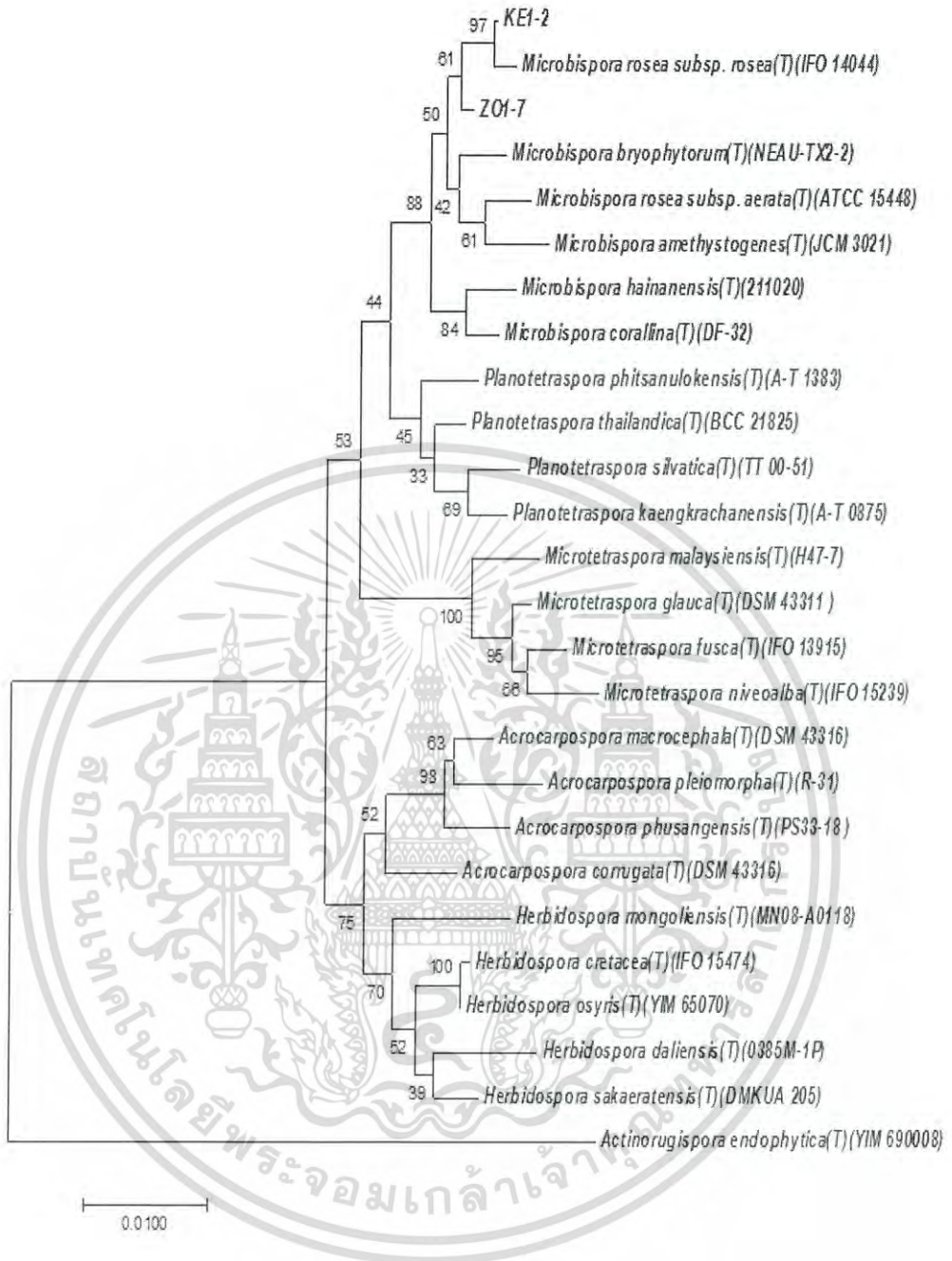
รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-2 และ ZO1-7 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(7) เชื้อไอโซเลต KE1-3

ลักษณะทางฟีโนไทป์

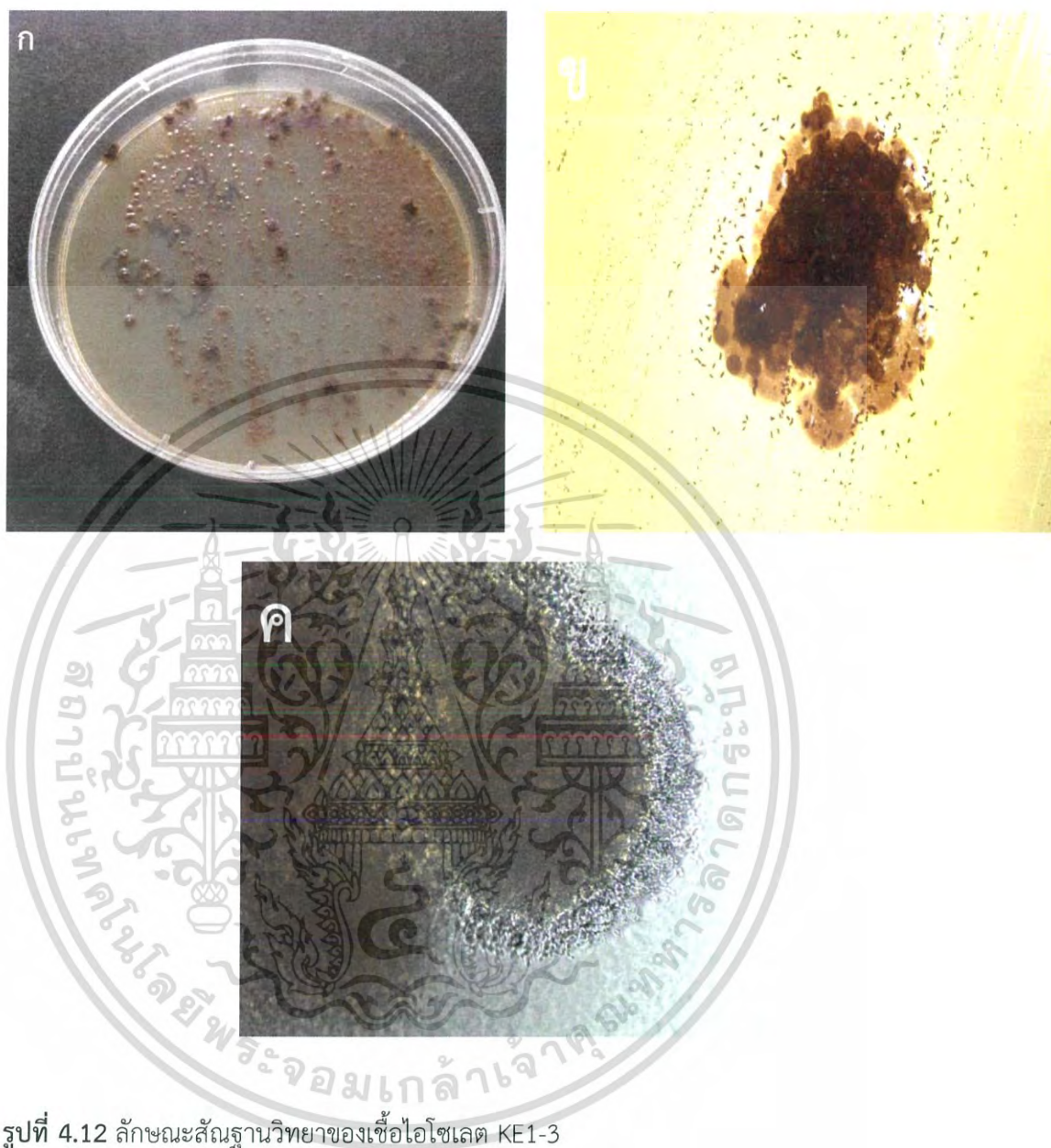
เชื้อไอโซเลต KE1-3 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.12 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้มอมเหลือง (deep orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มที่บอมเหลือง (dark orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.12 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างอยู่ที่ 7.2-7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครโอบสปอราไอโซเลต KE1-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 55 (รูปที่ 4.13)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



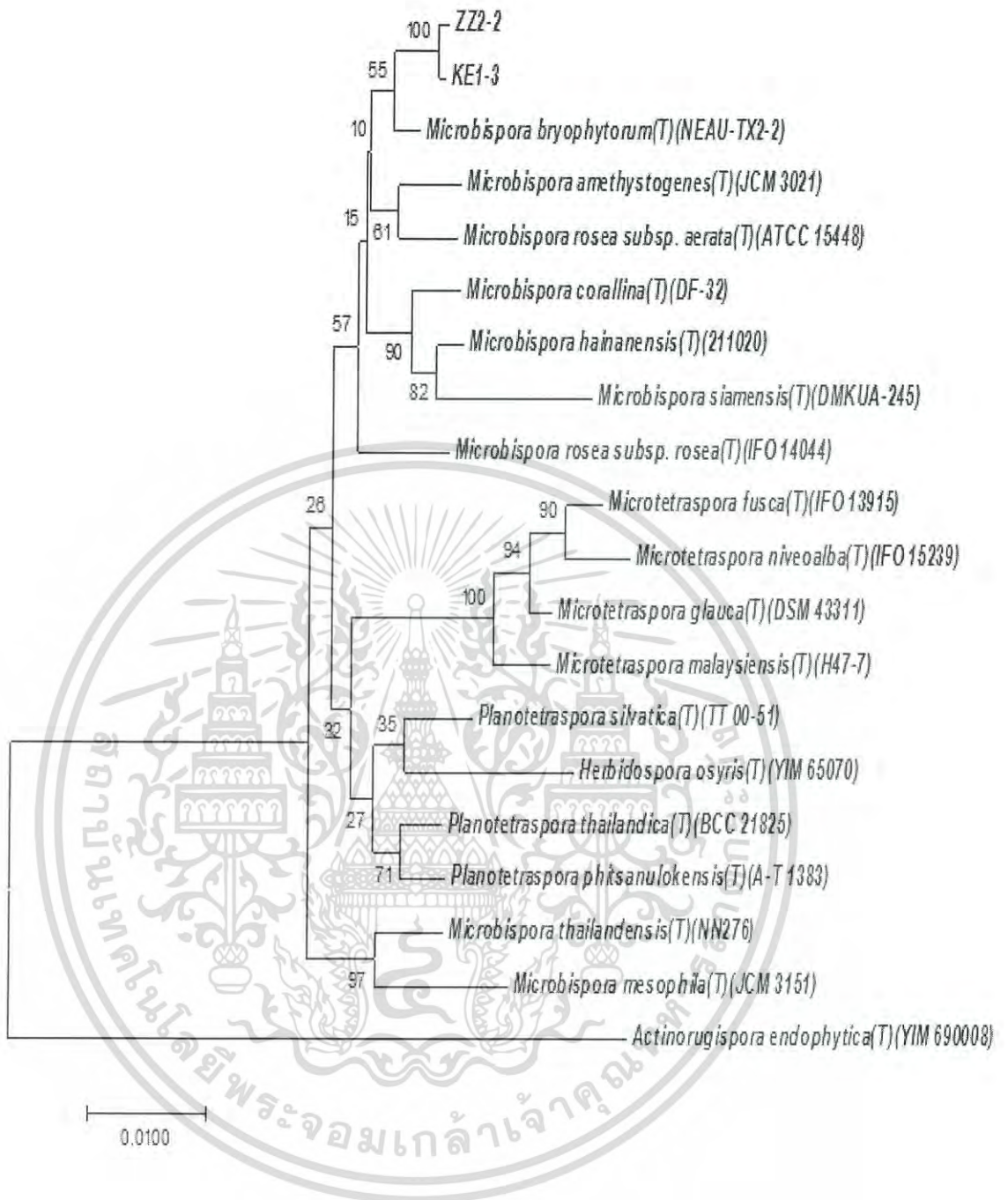
รูปที่ 4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-3

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-3 และ ZZ2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(8) เชื้อไอโซเลต KE2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

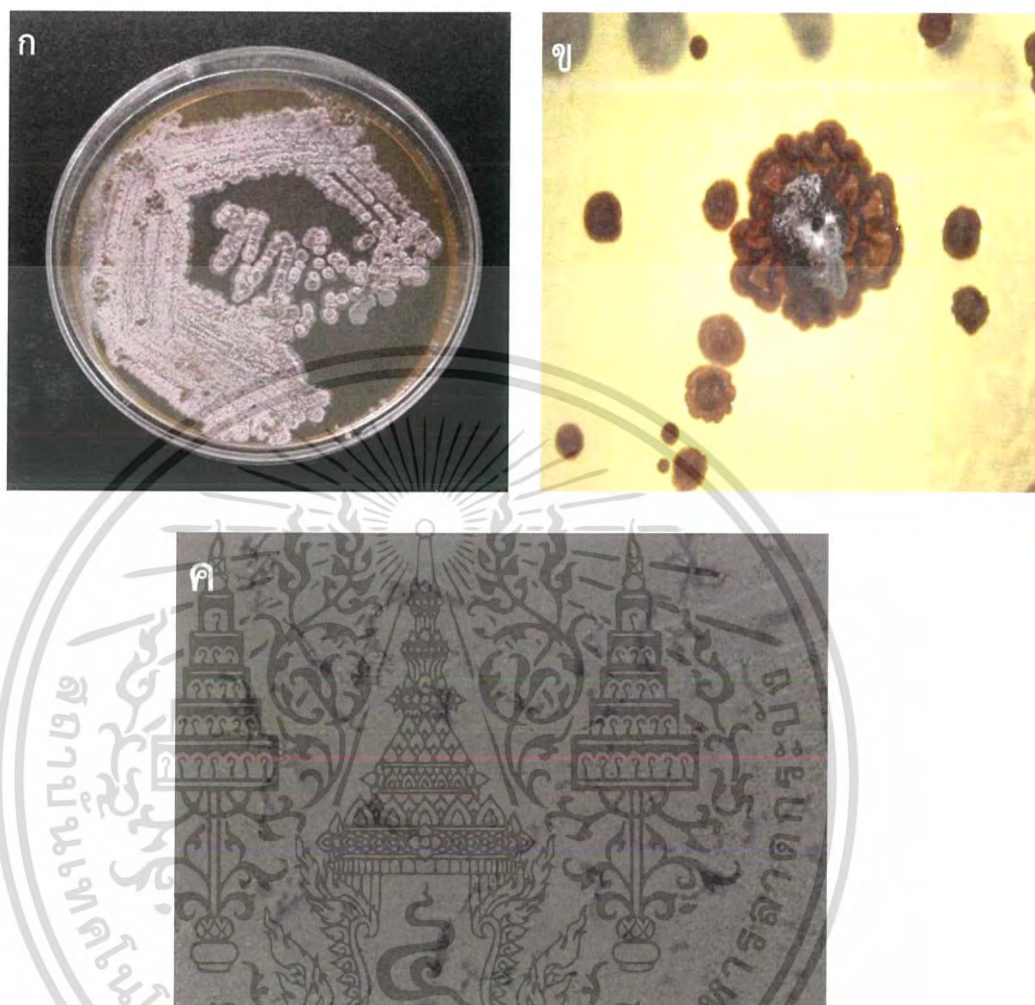
เชื้อไอโซเลต KE2-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.14 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอ่อนอมเหลือง (moderate orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้ม (strong orange) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.14 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครโอบสปอราไอโซเลต KE2-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.6% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 95 (รูปที่ 4.15)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



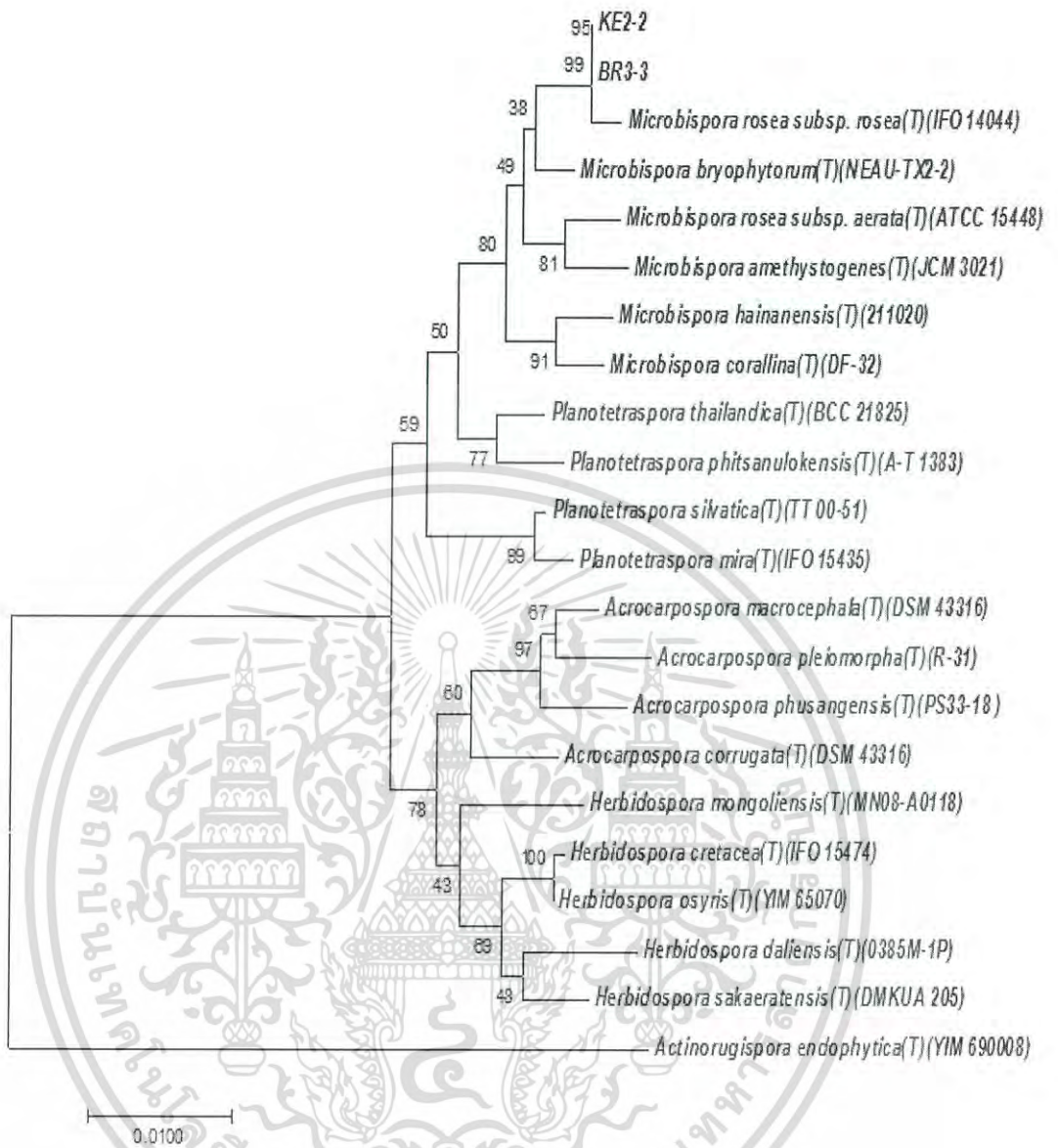
รูปที่ 4.14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE2-2 และ BR3-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(9) เชื้อไอโซเลต KE2-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

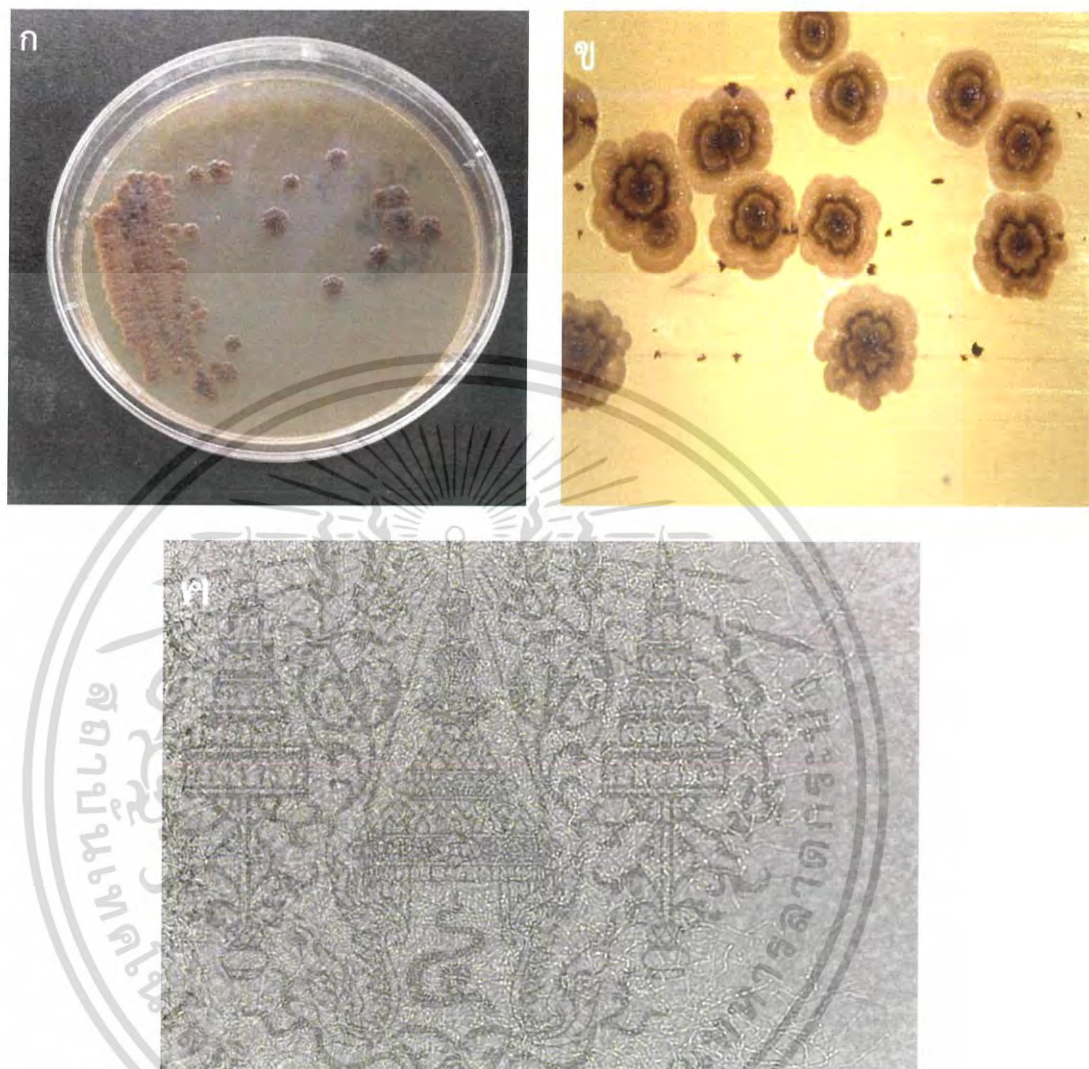
เชื้อไอโซเลต KE2-4 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.16 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีค่อนข้างเหลืองอ่อนอมชมพู (moderate yellowish pink) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มแดง (moderate reddish orange) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.16 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.2-7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต KE2-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.1% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 74 (รูปที่ 4.17)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



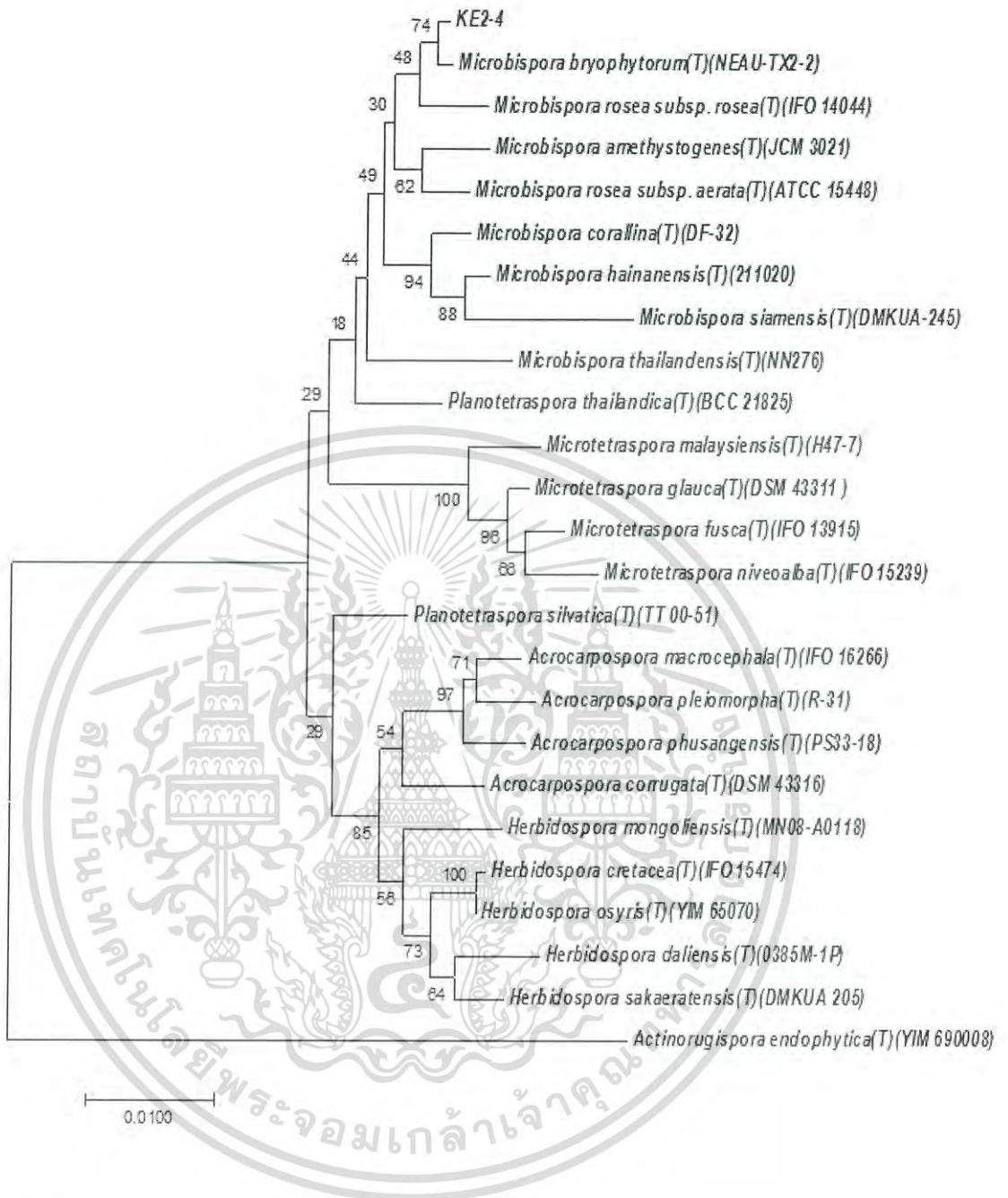
รูปที่ 4.16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE2-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(10) เชื้อไอโซเลต KE2-5

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต KE2-5 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.18 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีค่อนข้างเหลืองสว่างอมน้ำตาลอ่อน (light yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อนเหลืองอ่อน (pale orange yellow) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-5

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

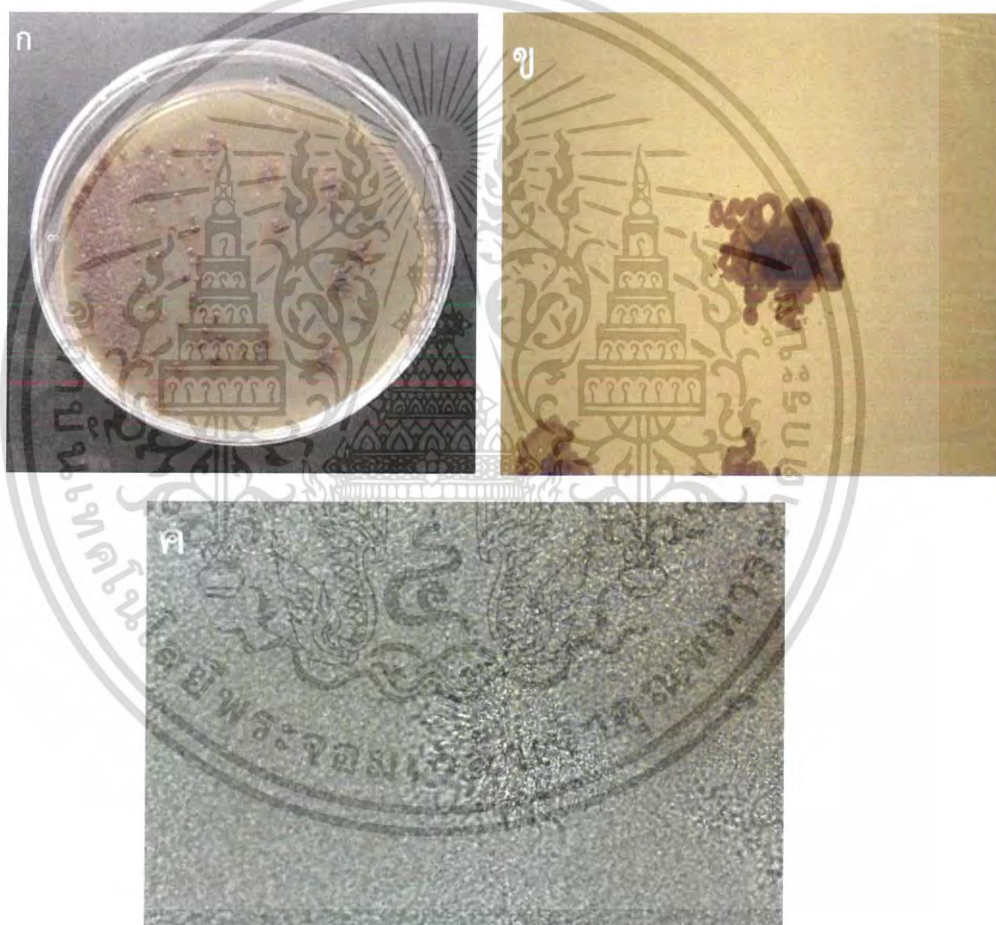
(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(11) เชื้อไอโซเลต KK1-10

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต KK1-10 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.19 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีค่อนข้างเหลืองที่บอมน้ำตาล (deep yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อนอมเหลือง (moderate orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.19 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.2-7.3 (ภาคผนวกข)



รูปที่ 4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KK1-10

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(12) เชื้อไอโซเลต KK1-11

ลักษณะทางฟีโนไทป์

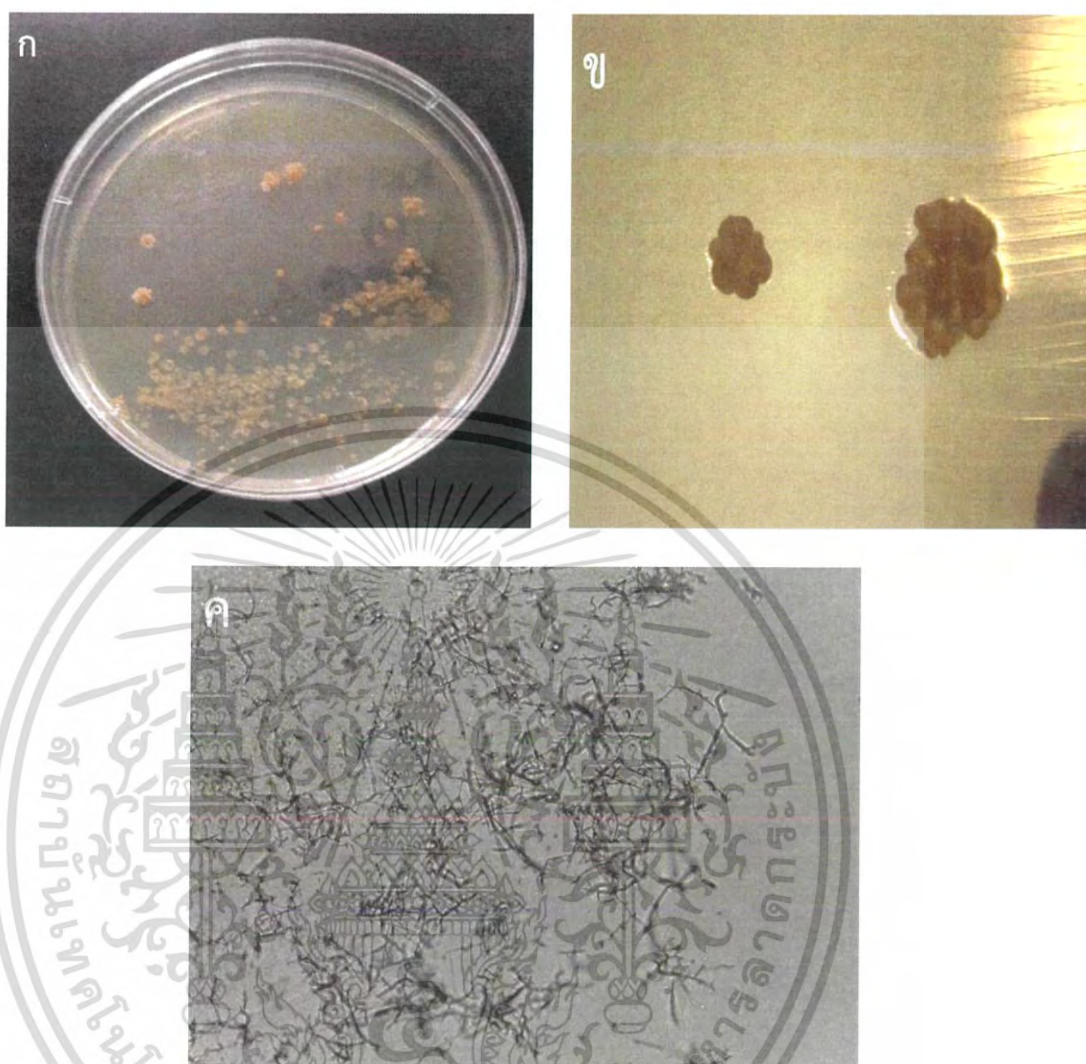
เชื้อไอโซเลต KK1-11 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.20 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม (strong yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน (vivid yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.20 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต KE2-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 66 (รูปที่ 4.21)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

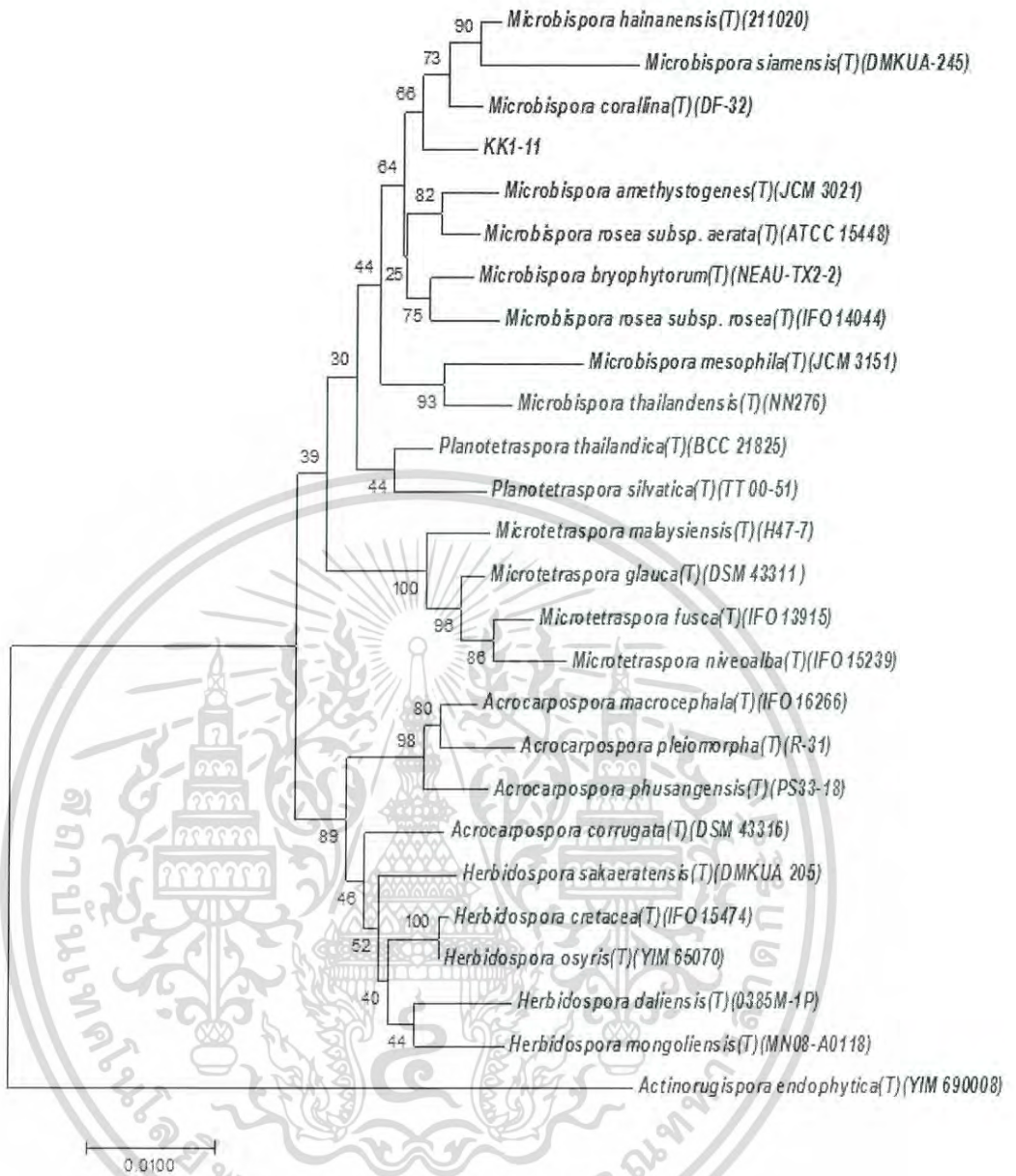


รูปที่ 4.20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัส KK1-11

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KK1-11 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(13) เชื้อไอโซเลต KM1-1

ลักษณะทางฟีโนไทป์

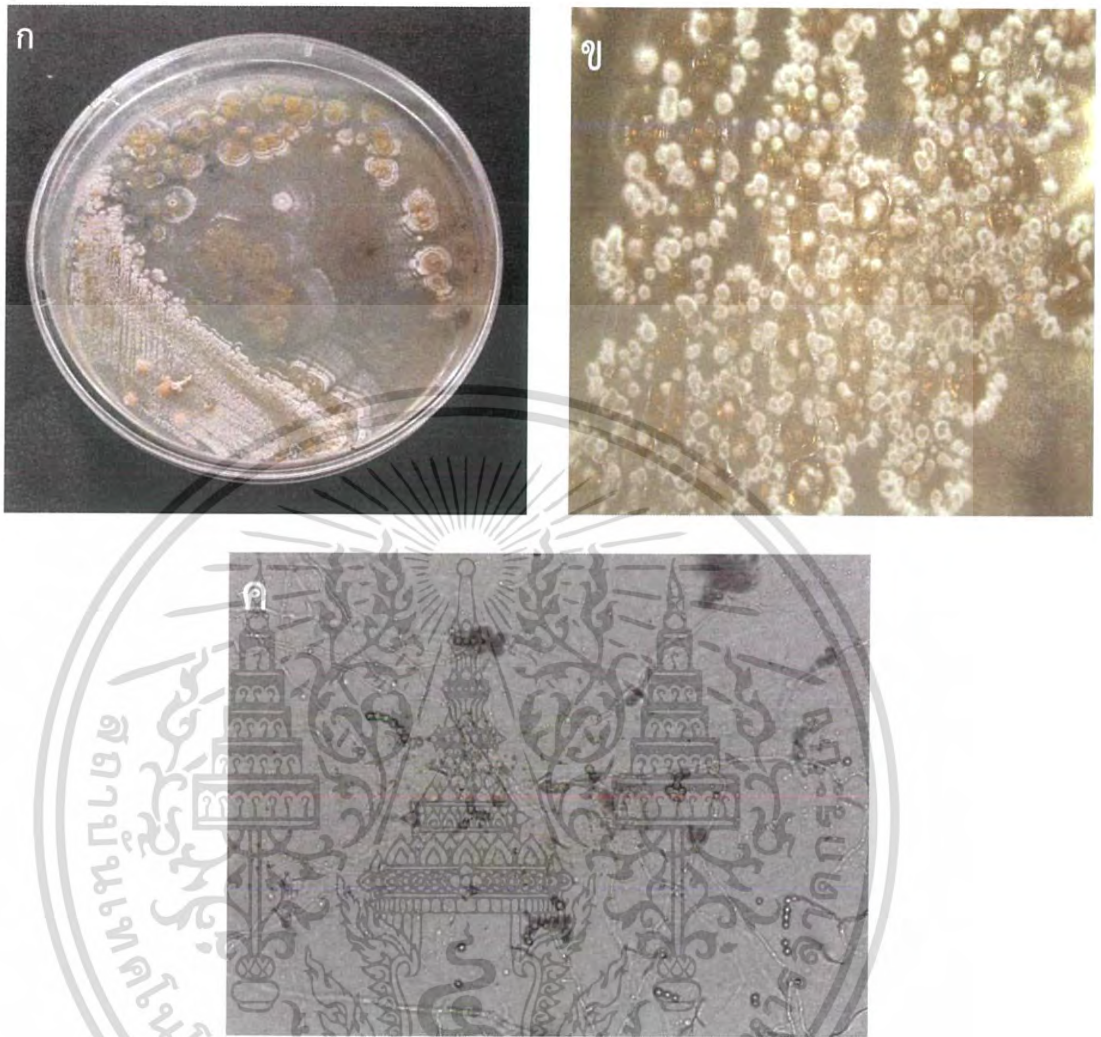
เชื้อไอโซเลต KM1-1 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.22 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (vivid yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน (vivid yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.2 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต KM1-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 55 (รูปที่ 4.23)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



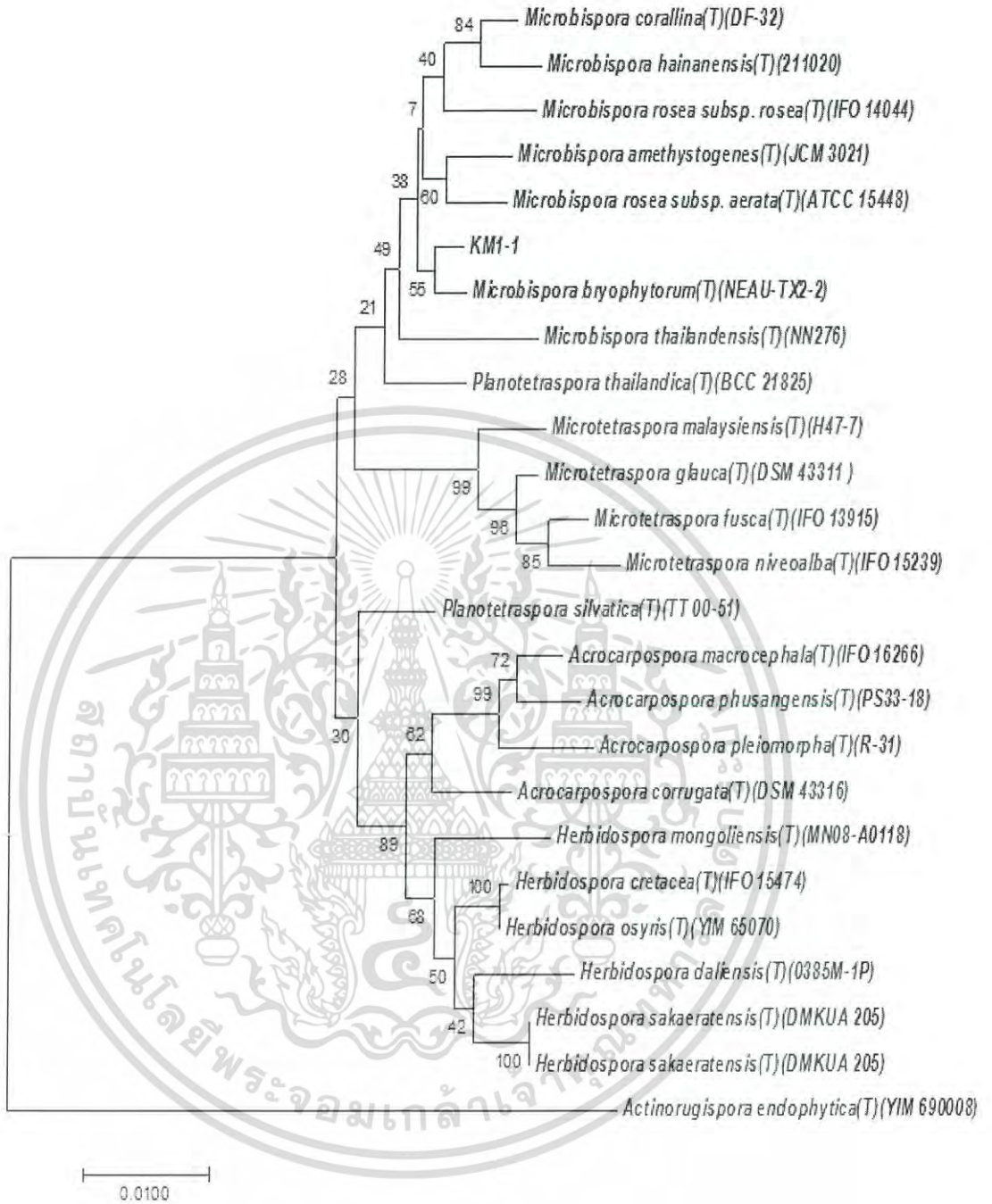
รูปที่ 4.22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-1

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KM1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(14) เชื้อไอโซเลต KM1-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

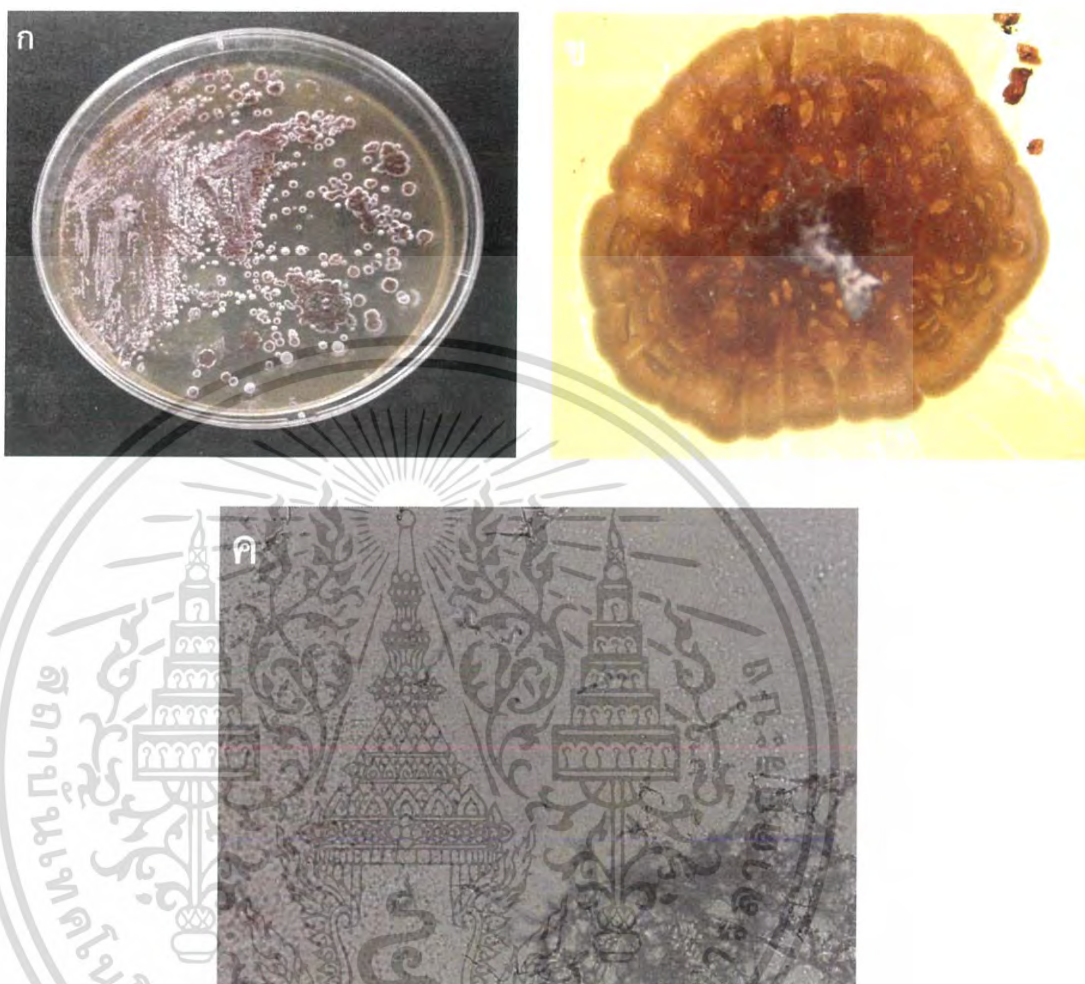
เชื้อไอโซเลต KM1-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.24 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้มอมน้ำตาล (strong yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีค่อนข้างเหลืองเข้มอมน้ำตาล (strong yellowish brown) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.24 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต KM1-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 51 (รูปที่ 4.25)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



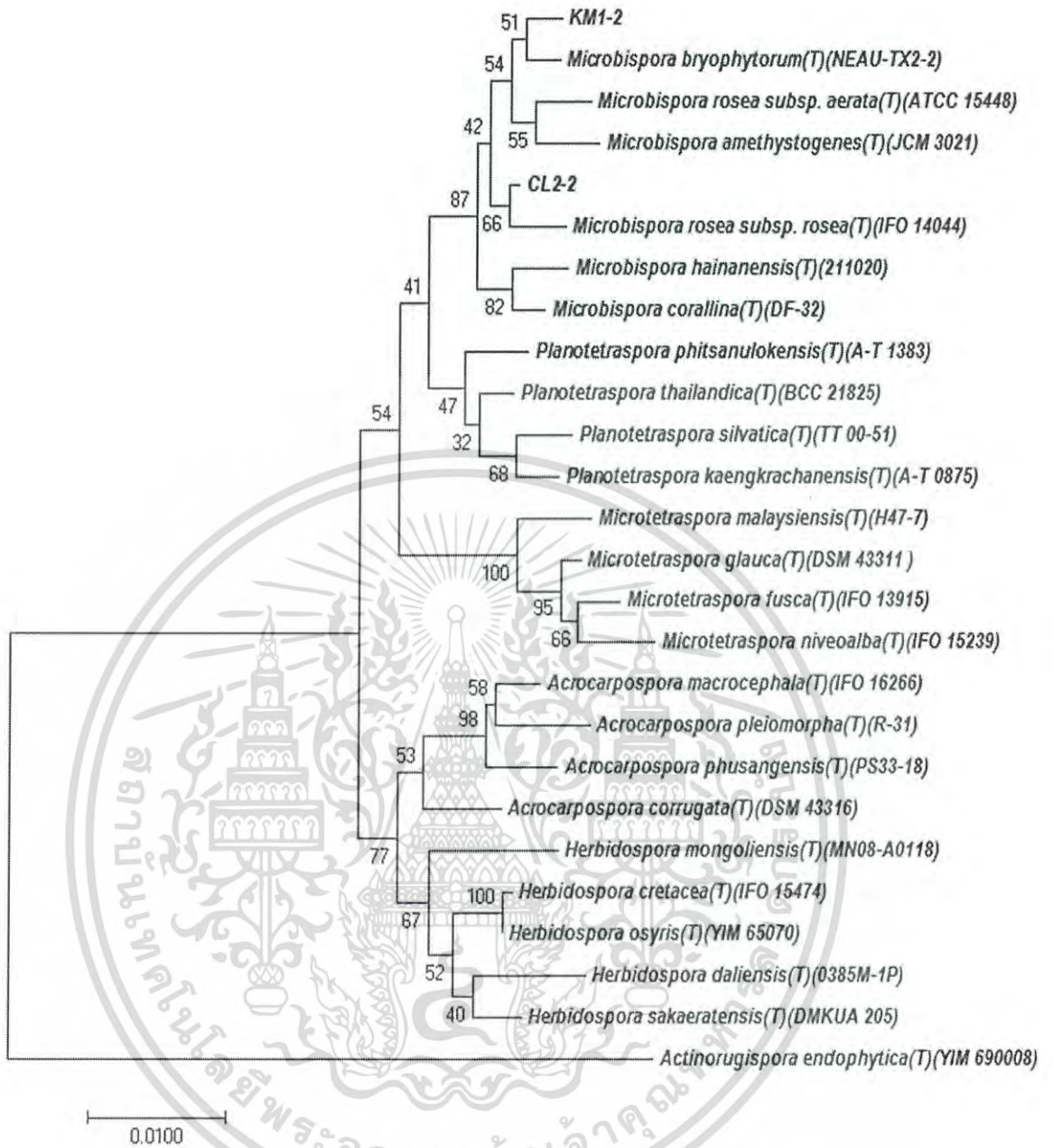
รูปที่ 4.24 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนิบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KM1-2 และ CL2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(15) เชื้อไอโซเลต ZO1-7

ลักษณะทางฟีโนไทป์

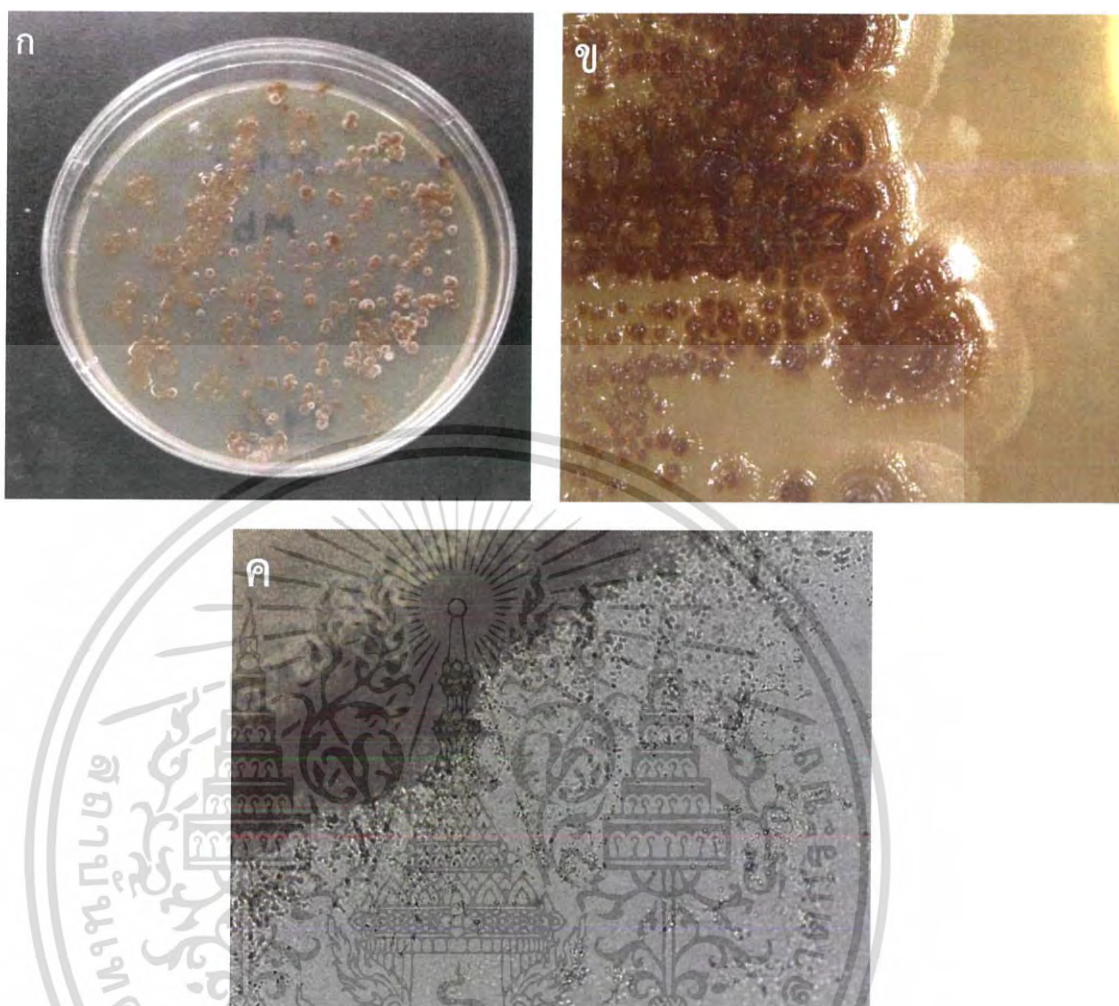
เชื้อไอโซเลต ZO1-7 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.26 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้มอมเหลือง (strong orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้มอมเหลือง (strong orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.26 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต ZO1-7 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.4% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 61 (รูปที่ 4.27)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



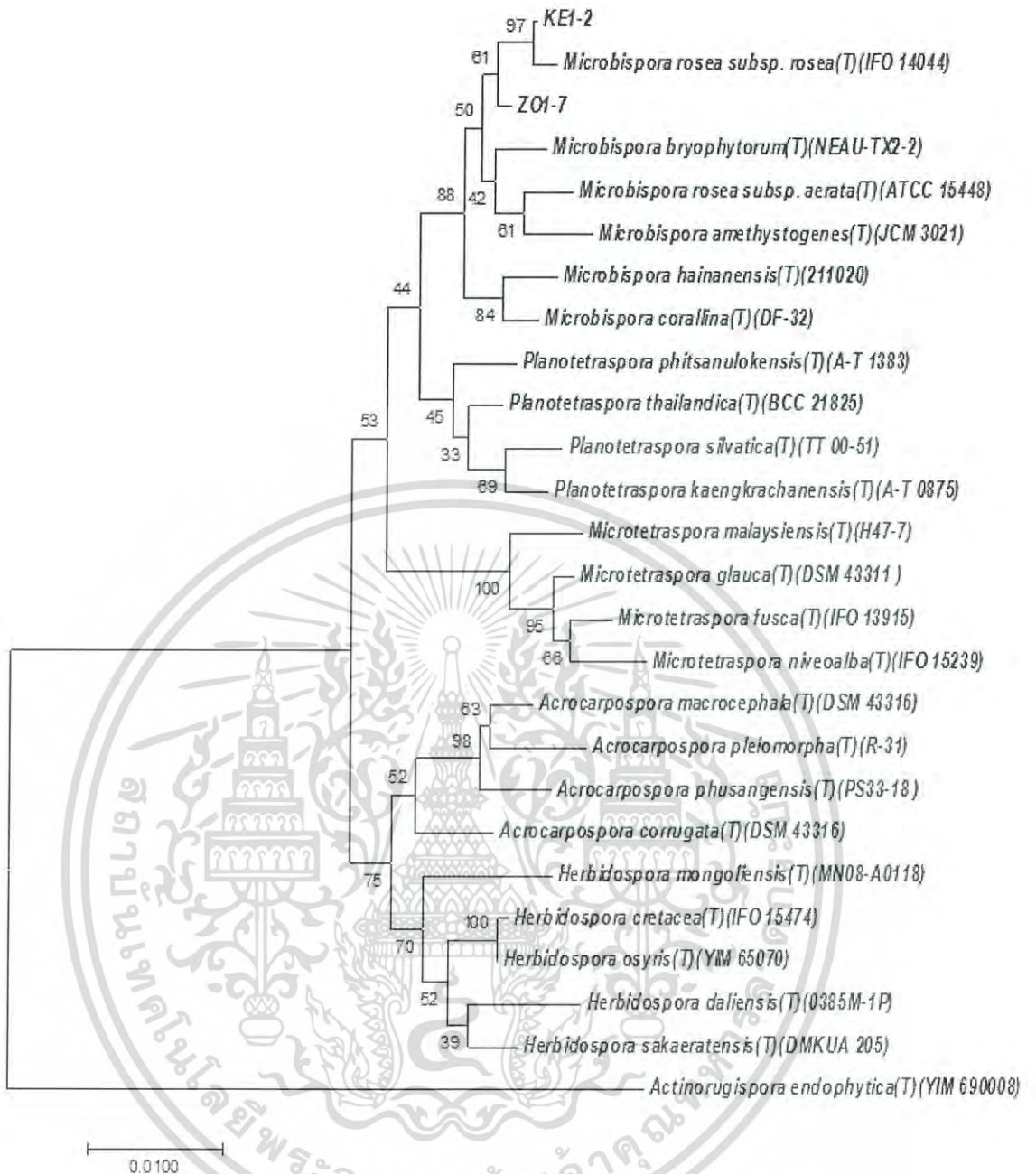
รูปที่ 4.26 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZO1-7

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZO1-7 และ KE1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(16) เชื้อไอโซเลต ZZ-H-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

เชื้อไอโซเลต ZZ-H-4 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.28 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอ่อนอมเหลืองอ่อน (pale orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มสว่างอมเหลือง (light orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.28 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP4 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ-H-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(17) เชื้อไอโซเลต ZZ1-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

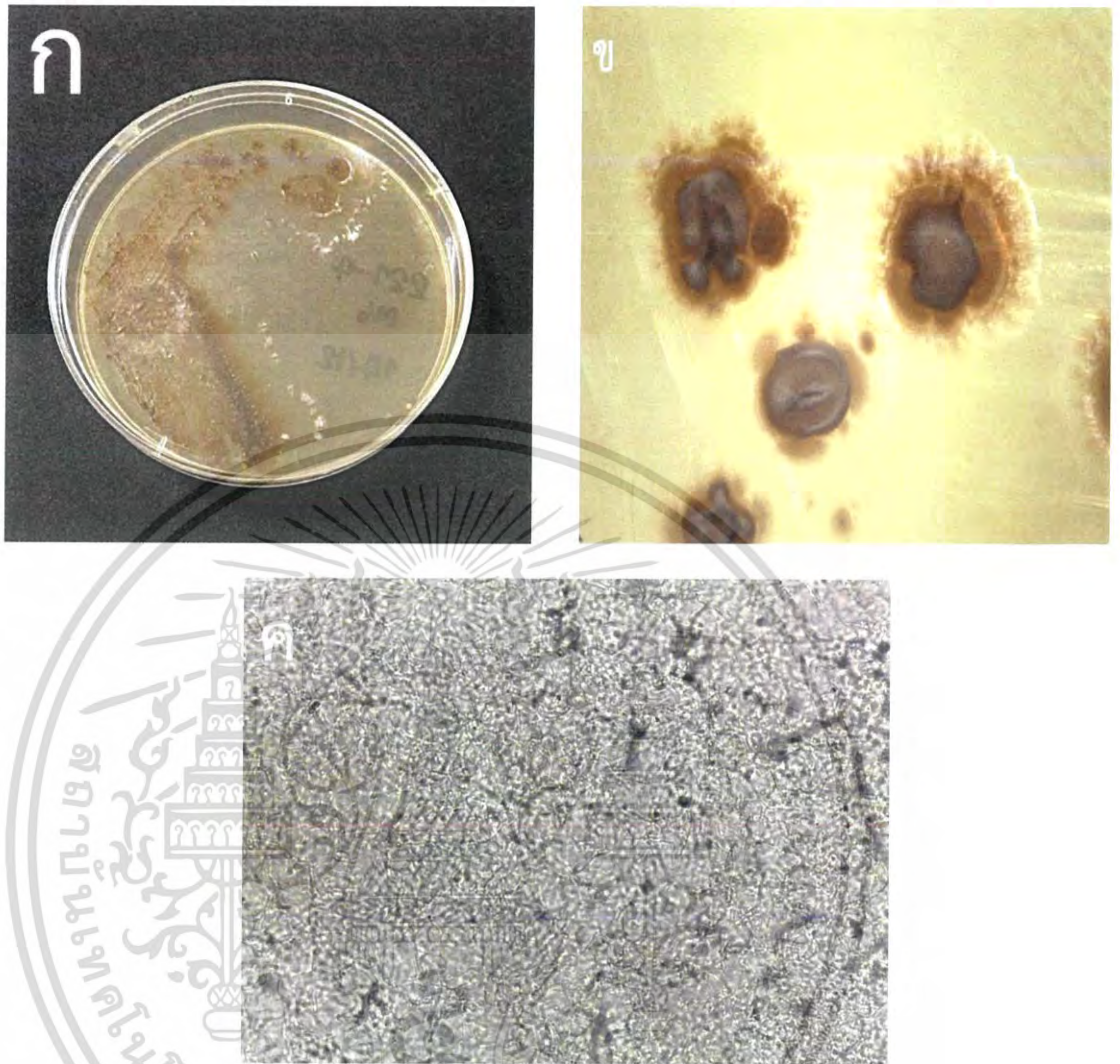
เชื้อไอโซเลต ZO1-7 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.29 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ที่บอมเหลือง (deep orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้มอมเหลือง (strong orange yellow) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.29 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต ZZ1-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.4% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 81 (รูปที่ 4.30)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

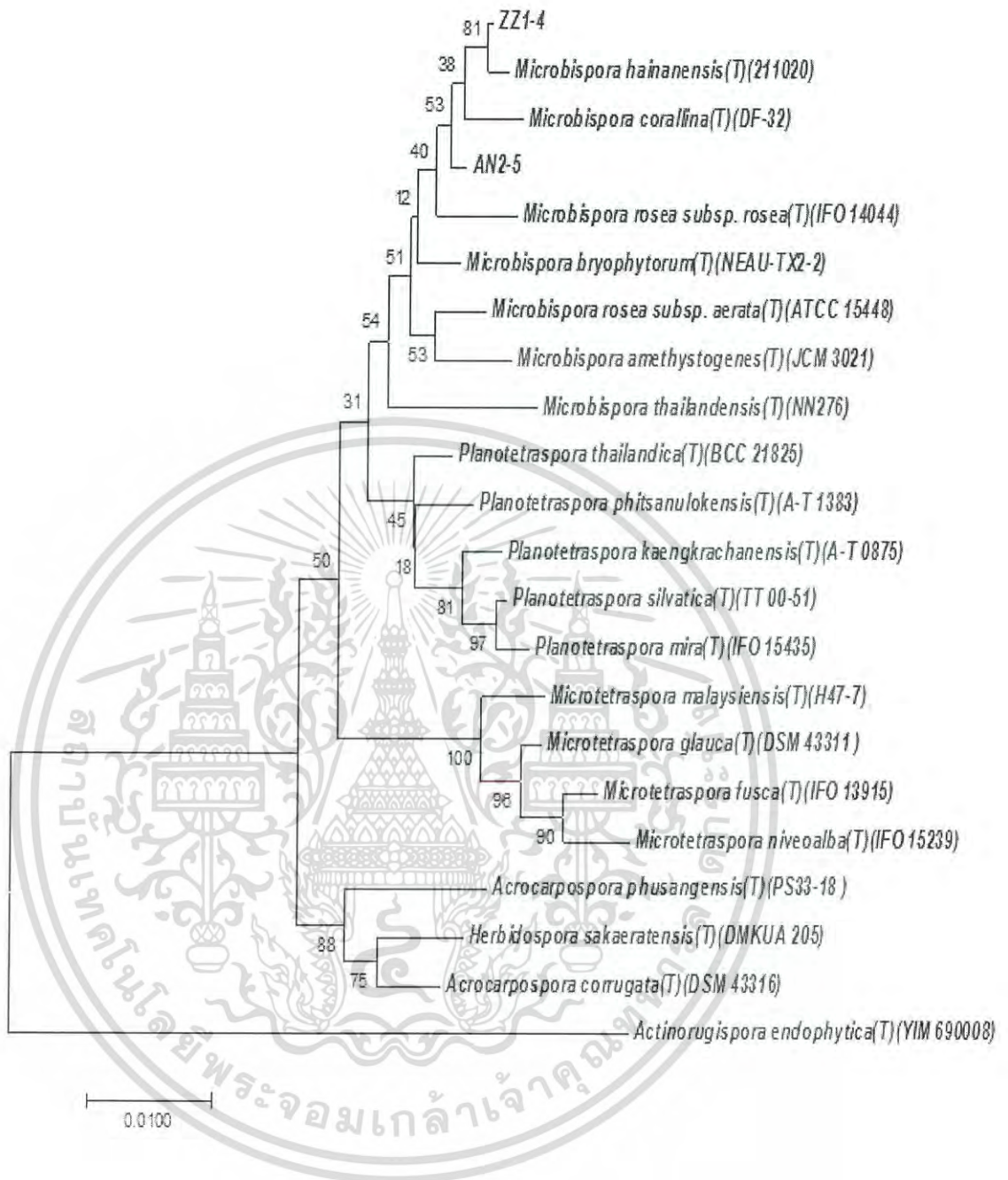


รูปที่ 4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ1-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZZ1-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(18) เชื้อไอโซเลต ZZ2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

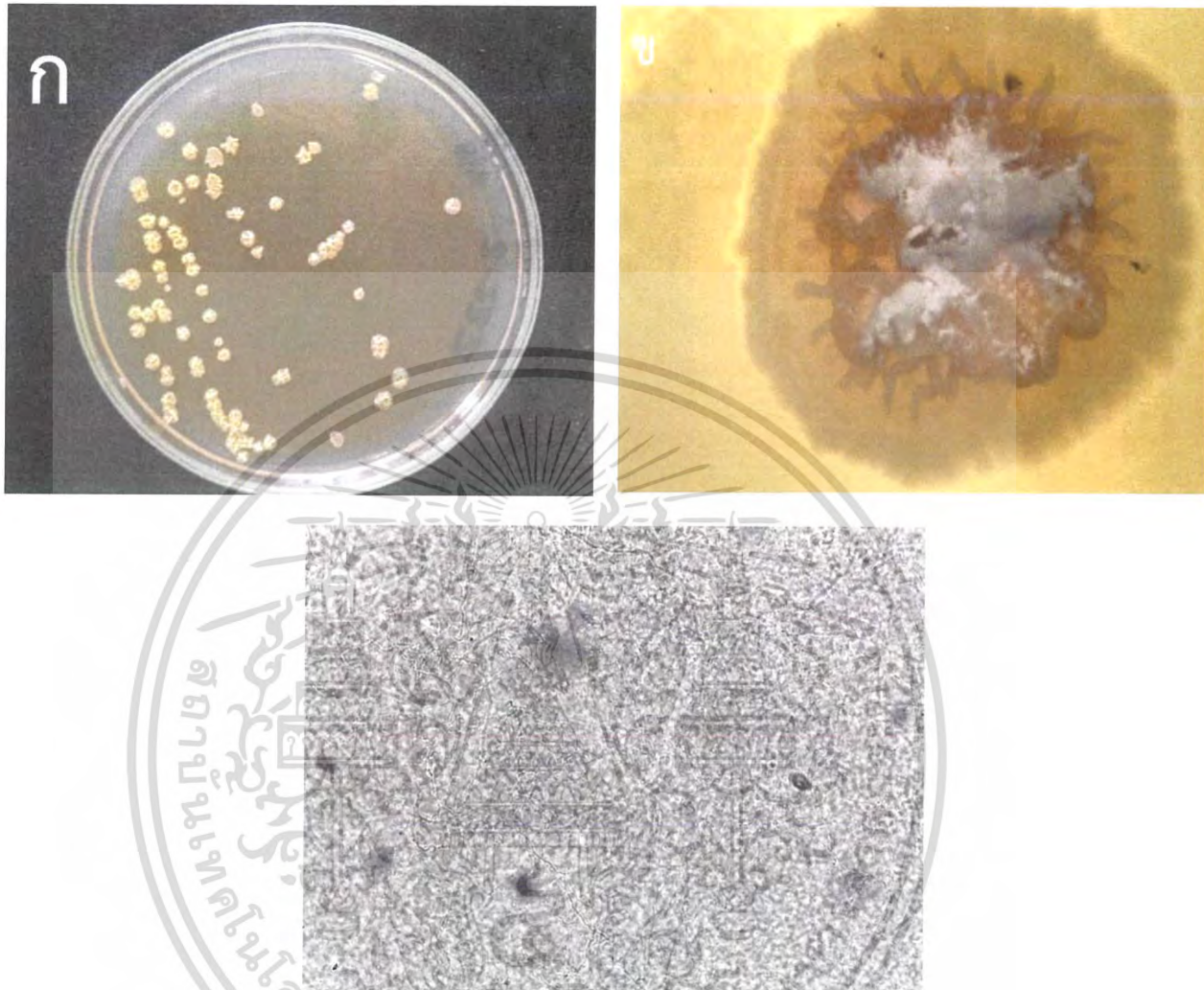
เชื้อไอโซเลต ZZ2-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.31 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล (strong yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีค่อนข้างเหลืองอมน้ำตาล (strong yellowish brown) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.31 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2, ISP4, ISP5 และ Czapek's sucrose agar (ภาคผนวก ข)

ลักษณะทางจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสพอราไอโซเลต ZZ1-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.4% (ภาคผนวก ค) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 49 (รูปที่ 4.32)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



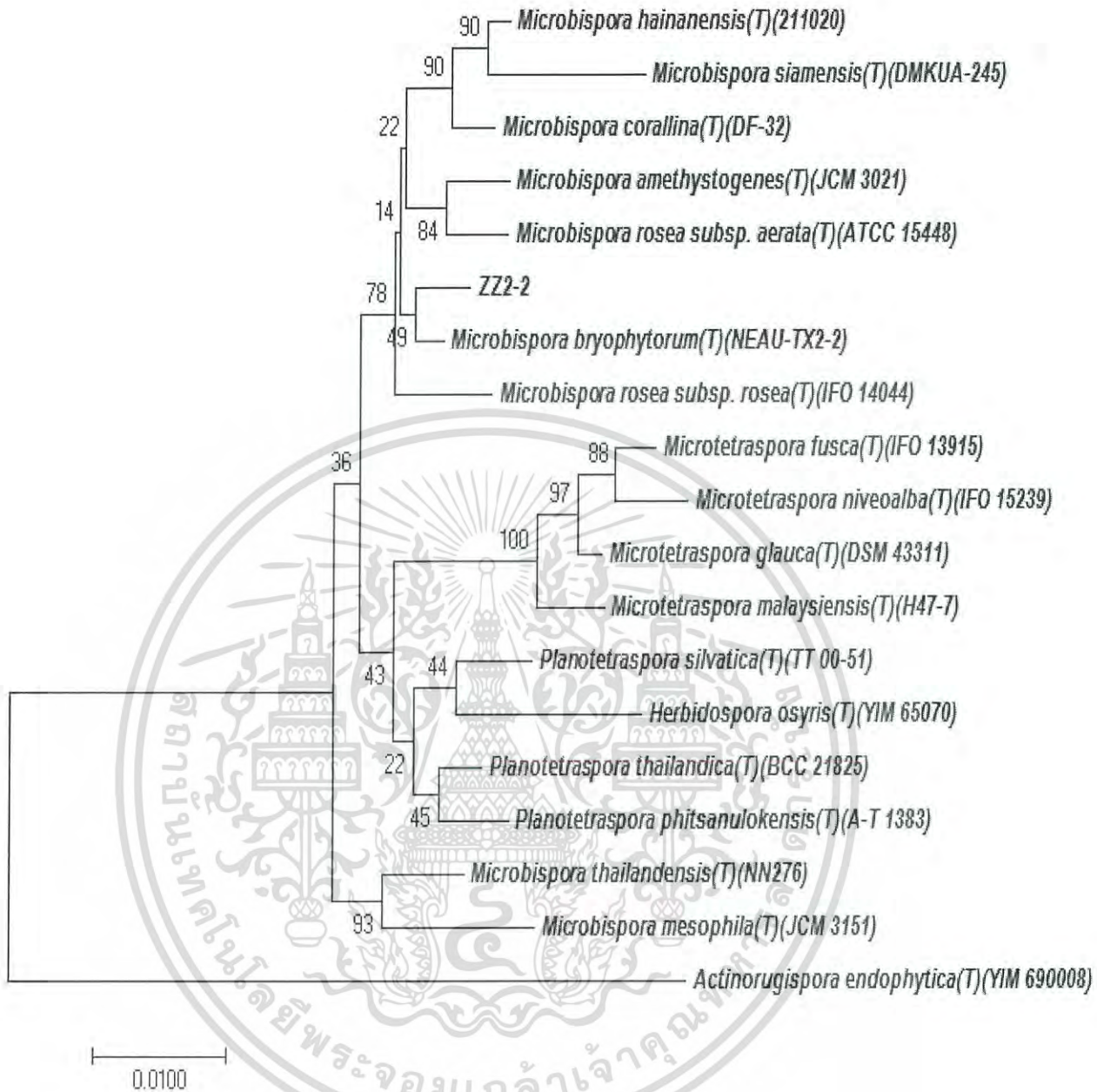
รูปที่ 4.31 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZZ-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล

(long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZZ2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเชื้อไมโครไบสพอร่า

นำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตจากน้ำหมักของเชื้อไมโครไบสพอร่าที่คัดเลือก มาทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทดังนี้

4.2.1 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

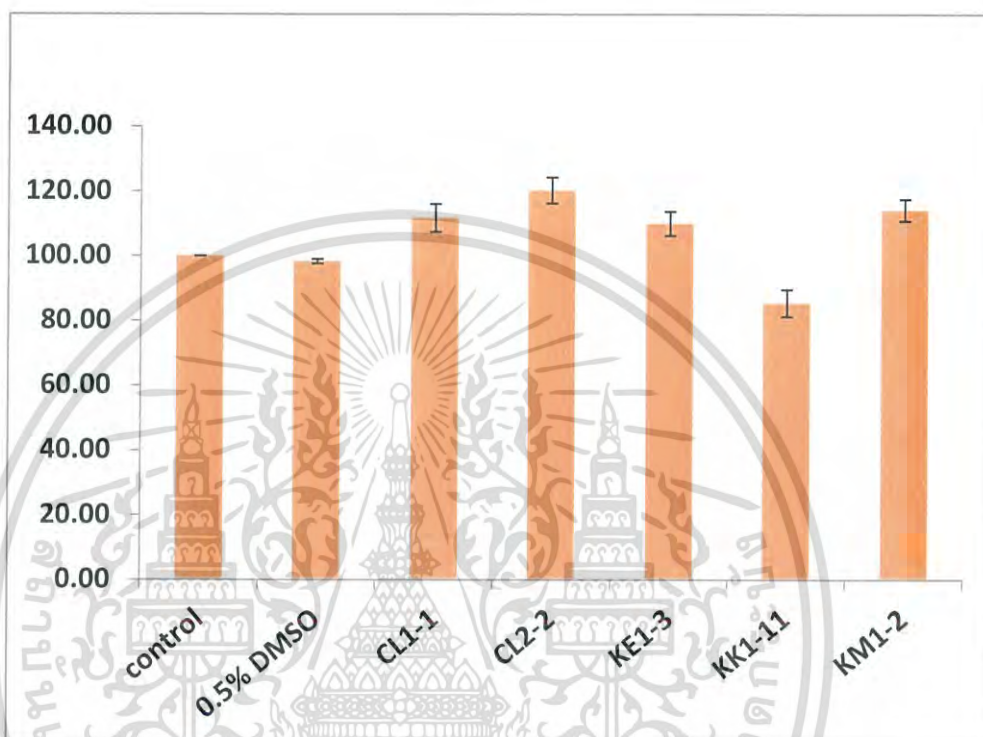
จากการทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของเชื้อไมโครไบสพอร่าที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรจำนวน 18 ไอโซเลต ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ โดยผลที่ได้พบว่ามีเชื้อไมโครไบสพอร่า 5 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์มากพอที่จะทำการทดลองได้ซึ่งได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, KK1-11 และ KM1-2 จากนั้นจึงนำมาทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทโดยได้รับสารสกัดหยาบจากเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตที่ความเข้มข้น 1 ng/mL เท่ากัน ผลการทดสอบพบว่าที่ 0.5%DMSO ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท สารสกัดหยาบจากเชื้อ CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุม (มากกว่าร้อยละ 100) ยกเว้น KK1-11 ที่แสดงแนวโน้มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (แผนภูมิที่ 4.1) ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อ CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 ไปทำการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective ต่อด้วยวิธี serum deprivation

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL

รหัสเชื้อ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าความคาดเคลื่อน
CL1-1	104.63	111.34	119.40	111.79	4.27
CL2-2	123.15	112.37	125.37	120.30	4.01
KE1-3	106.48	117.53	105.97	109.99	3.77
KK1-11	87.04	91.75	77.61	85.47	4.16
KM1-2	117.59	117.53	107.46	114.19	3.37
0.5% DMSO	99.07	98.97	97.01	98.35	0.67
Control	100	100	100	100.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.33 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL



4.2.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท

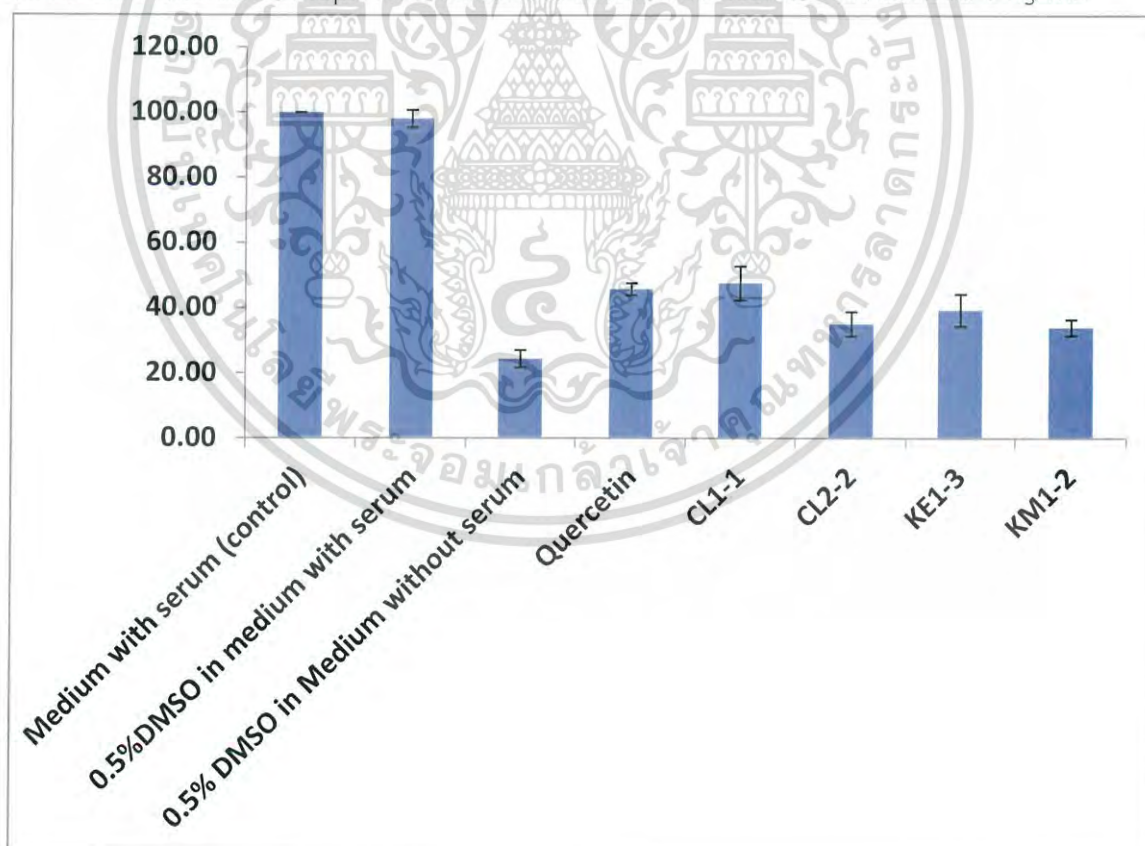
จากการทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดหยาบจากเชื้อไมโครโอบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่คัดเลือกจากฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml เท่ากัน สารสกัดหยาบจากเชื้อ CL1-1, CL2-2, และ KM1-2 สามารถปกป้องเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากสภาวะ oxidative stress ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสังเกตได้จากอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่ากลุ่มสภาวะ oxidative stress ยกเว้นสารสกัดหยาบจากเชื้อ KE1-3 ที่แม้ว่าจะสามารถปกป้องเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากสภาวะ oxidative stress ได้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดหยาบจากเชื้อ CL1-1 สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้ใกล้เคียงกับ positive control (แผนภูมิที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL

รหัสชื่อ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าความคาดเคลื่อน
CL1-1	56.30	38.28	48.17	47.58	5.21
CL2-2	42.30	29.43	33.55	35.09	3.79
KE1-3	32.49	36.60	48.84	39.31	4.91
KM1-2	35.57	29.19	37.21	33.99	2.45
Quercetin	44.41	49.28	43.43	45.71	1.81
a-MEM+DMSO	27.95	19.14	25.91	24.33	2.66
a-MEM	34.16	20.57	27.74	27.49	3.92
0.5% DMSO	95.03	103.35	95.62	98.00	2.68
control	100	100	100	100.00	0.00

ภาพที่ 4.34 ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL



* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสภาวะ oxidative stress

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรรัง 18 ไอโซเลต มาศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางจีโนม 16S rRNA gene สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่ทำการศึกษาคือเป็นเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา

การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 โดยการนำสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml จากเชื้อ 5 ไอโซเลต ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, KK1-11 และ KM1-2 พบว่าพบว่ามีสารสกัดหยาบจากเชื้อ KK1-11 มีอัตราการรอดของเซลล์น้อยที่สุดคือ ร้อยละ 85.47 ซึ่งมีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์จึงไม่นำไปทดสอบต่อ ดังนั้นมีเพียงสารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 ที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต ร้อยละ 111.79, ร้อยละ 120.30, ร้อยละ 109.99 และ ร้อยละ 114.19 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา เมื่อคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท P19 จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบจากทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml มาทำการทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท กับเซลล์ประสาท P19 ที่สภาวะ Oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้ร้อยละ 47.58, ร้อยละ 35.09, ร้อยละ 39.31 และ ร้อยละ 33.99 ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดหยาบจาก KE1-3 ที่ถึงแม้ว่ามีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจาก CL1-1 มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ใกล้เคียงกับ positive control (Quercetin) มากที่สุด

จากงานวิจัยที่ศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในสภาวะ Oxidative stress (Bahareh Eftekharezadch และคณะ., 2010) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการทดลองในครั้งนี้โดยสามารถกล่าวได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุลไมโครไบสปอราสามารถออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลการทดลองทั้งหมดทำให้ทราบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต เนื่องจากสารสกัดยับยั้งจากไอโซเลตดังกล่าวนี้เมื่อนำมาทดลองแล้วพบว่ามีความมีประสิทธิภาพได้จึงควรนำมาศึกษาต่อ เช่น ศึกษากระบวนการปกป้องเซลล์ประสาทในสภาวะ Oxidative Stress หรือนำไปศึกษากับเซลล์ประสาทชนิดอื่นเพิ่มเติม

และจากการศึกษาควรมีการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทเพิ่มเติมเพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดยับยั้งเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านวิทยาศาสตร์และด้านสาธารณสุขมากยิ่งขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- จิตติ ท่าไฉ. 2547. เชื้อสกุลไมโครโสปอรา. วารสารวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์.
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Adam, A., Petil, J. F., & Wietzerbin-Falszpan, J. 1969. L acid N-glycolyl-muramulque, contituant des Parois de *Mycobacterium smeg matis* identification par spectrometric de masse. *FEBS Lett.* 4, 87-92.
- Ahoronowitz, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotics biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 209-233.
- Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Bowden, G.H., & Hardie, J.M. 1977. Fatty and mycolic composition of *Bacterionema matrucholii* and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 98, 444-451.
- A. Schatz, E. Bugie, W. Sa, 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55. 1944, pp. 66-69.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E. and Lechevalier, H.A. 1964. Rapid differentiation between *Norcadia* and *Streptomyces* by paper chromatography whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* 12, 421-423.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58, pp 1-26.
- Carlone, G.M., & Anet, F.A.L. 1983. Detection of menaquinone-6 and novel methyl-suvttituted menaquinone-6 in *Camphylobacter jejuni* and *Compylobacter fetus* subsp. *Fetus*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 3385-3393.
- Collins, M.D., & Langworthy. J.A. 1983. Respiratory quinone composition of som acidophilic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 4,295-304.
- Collins, M.D., & F. Fernandez. 1984. Menaquinone-6 and thermoplasmaquinone-6 in *Wolinella succinogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 273-276.
- Collins, M.D., & Langworthy, T.A. 1983. Respiratory quinone composition of some acidophilic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 295-304.
- Coyne, J. C. 1990. Interpersonal processes in depression. In G. I.Keitner (Ed.), *Depression and families.* pp. 31-54. Washington, DC: American Psychiatric Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Eftekhazadeh B1., Hamed J., Mohammadipanah F., Khodagholi F., Maghsoudi N., & Klenk HP. 2010. Inhibition of oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 May;86. 6:1805-11.
- Goodfellow, M. & O'Donnell, A.G. 1993, *Roots of bacterial systematics, in "Handbook of new bacterial systematics"*. M. Goodfellow & A.G. O'Donnell. pp. 3-54. Academic Press, London, New York.
- Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J. & Curtis, T. P. 1998. Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Water Sci Technol* 37, 511-519.
- Hayakawa, M., T.Sadakata, T.Kajiura & H. Nonomura 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J.Ferment.Bioeng.*, 72: 320-326
- Ishii, M., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., & Minoda, Y. 1983. 2-Methylthiol,4-naptoquinone, a new quinone from an extremely thermophilic hydrogen bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 47, 167-169.
- Iwai, Y., & Omura, S. 1982. Culture condition for screening of new antibiotic. *J. Antibiotics.* 35, 123-141.
- Mia Y. Summers., Margaret Leighton., Danni Liu., Kevin Pong., & Edmund I. Graziani. 2006 3-Normeridamycin: A Potent Non-Immunosuppressive Immunosuppressant Ligand is Neuroprotective in Dopaminergic Neurons. *J. Antibiot.* 59. 3: 184-189, 2006
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes Japan.* Japan.
- Miyagawa, E., Azuma, R., & Suto. T. 1974. Distribution of sphingolipid in bacteroides species. *J. Gen. appl. Microbiol.* 24,341-348
- Miyagawa, E., Anuma, R., Suto, T., & Yano, I. 1979. Occurrence of free caramides in *Bacteroides fragilis*. *J. Biochem.* 86, 311-320.
- Nonomura, H. 1989. Genus *Streptosporangium* Couch 1955, 148AL. In: S.T. Williams (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Vol. 4, pp. 2545-2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nakajima, Y., Ktpreechavanich, V., Suzuki, K.I. , & Kudo, T. 1999.
Microbispora coralline sp. Nov., a new species of the genus *Microbispora*
 isolated from Thai soil. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 49, 1761-1767
- Okami Y, Hotta K . 1988. Search and discovery of new antibiotics, In: Goodfellow M,
 Williams ST, Mordarski M . ed. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press,
 Inc., San Diego, pp. 33-67
- Redfearn, E.R., & Powls, R. 1968. The quinines of green photosynthetic bacteria. *J.*
Biochem. 106, 50.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell wall and
 their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477
- Seong-Hwan Kim., Hyeonseok Ko., Hea-Son Bang., Seon-Hui Park., Dong-Gyu Kim., Hak
 Cheol Kwon., et al. . 2011. Coprismycins A and B, neuroprotective
 henylpyridines from the dung beetle-associated bacterium,
Streptomyces sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 . 2011. 5715–5718
- Shaw, N. 1974. Application of molecular Biological method in taxonomy of genus
Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* 17, 63—108
- Tahara, Y., Yamada, Y., & Kondo. K. 1976b. The ornithine and taurine-containing
 cerilipin. *Agric. Bot. Chem.* 40, 1449-1450.
- Shimi, I.R., Dewedar, A., & Abdallah, N, 1971. Yemenimycin A new antibiotics. *J.*
Antibiotics. 24, 283-289.
- Uchida, K., & Aida, K. 1977. Acyl type of bacterial cell-wall its simple identification by
 colorimetric method. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23, 249-260.
- Uchida, K., & Aida, K. 1979. Taxonomic significancenof cell-wall acyl type in
Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia group by a glycolate test. *J.*
Gen. Appl. Microbiol. 25, 169-183.
- Uchida, K., & Aida, K. 1984. An improved method for the glycolate test for simple
 identification of the acyl type of bacterial cell-well. *J. Gen. Appl. Microbiol.*
 30,131-134.
- Weinberg, E.D. 1962. Trace-metal control of specific biosynthetic process.
Perspect. Biol. Med. 5 432-445.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Yamada, Y., & Kondo, K. 1973. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 19, 59-77.
- Yamada, Y., & Arimoto, M. and Kondo, K. 1976. Coenzyme Q system in the classification of apiculate yeasts in the genera *Nadsonia*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, and *Wickerhamia*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 293-299.
- Yamada, Y., Nojiri, M., Matsuyama, M., & Kondo, K. 1976. Coenzyme Q system in the classification of the ascosporogenous yeast genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, and *Endomycopsis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 325-337.
- [online]. Available : <http://emsb.qc.ca>.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract – malt extract broth (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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal 20.0 กรัม

Tract salt solution 1.0 มิลลิลิตร

Agar 20.0 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inorganic salts – starch agar (ISP4)

Soluble starch	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 salt 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 salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone – yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar	36	กรัม
Yeast extract	1.0	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 (anhydrous)	1.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม

Trace salt solution 1.0 มิลลิลิตร

Agar 20.0 กรัม

น้ำกลั่น 1 ลิตร

pH 7.2-7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salts solution

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

Glucose asparagine agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgSO ₄	0.5	กรัม
KCl	0.01	กรัม
Agar	15.0	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	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.8		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
AN2-5	ISP2	ดี	deep orange yellow	strong yellowish brown	-
	ISP3	ดี	brownish orange	brownish orange	-
	ISP4	ปานกลาง	Light grayish yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP5	น้อย	moderate yellow	vivid yellow	-
	ISP6	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP7	น้อย	grayish yellow	grayish yellow	-
	Glu.A.	น้อย	deep yellow	light yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	dark yellow	brilliant orange yellow	-
BR3-3	ISP2	ดี	dark orange yellow	strong orange yellow	-
	ISP3	ดี	strong orange	vivid orange	-
	ISP4	ปานกลาง	moderate orange	moderate orange	-
	ISP5	น้อย	strong reddish orange	strong reddish orange	-
	ISP6	ปานกลาง	moderate yellow	Light grayish yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	grayish yellow	grayish yellow	-
	Glu.A.	น้อย	brilliant orange yellow	Moderate orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	yellowish white	yellowish white	-
	N.A.	น้อย	Light grayish yellowish brown	brilliant orange yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
CL1-1	ISP2	ดี	strong yellow	strong orange yellow	-
	ISP3	น้อย	moderate yellowish pink	moderate yellowish pink	-
	ISP4	ปานกลาง	dark orange yellow	light orange yellow	-
	ISP5	น้อย	moderate orange yellow	vivid yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	light orange yellow	Light grayish yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	moderate orange yellow	moderate orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	vivid yellow	light orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	pale yellow	pale yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	vivid yellow	strong orange yellow	-
CL2-2	ISP2	ดี	deep orange yellow	deep yellow	-
	ISP3	ดี	light olive brown	light olive brown	-
	ISP4	ปานกลาง	dark orange yellow	pale orange yellow	-
	ISP5	น้อย	deep orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	vivid orange yellow	moderate orange yellow	-
	ISP7	น้อย	deep yellow	strong yellow	-
	Glu.A.	น้อย	dark orange yellow	pale orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	strong orange yellow	light yellowish brown	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสโคดีโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
CS-R-4	ISP2	ดี	vivid orange yellow	strong yellow	-
	ISP3	ปานกลาง	vivid orange yellow	deep orange yellow	-
	ISP4	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	ISP5	น้อย	light orange yellow	light orange yellow	-
	ISP6	น้อย	dark orange yellow	strong orange yellow	-
	ISP7	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	pale orange yellow	dark orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	light grayish yellowish brown	light grayish yellowish brown	-
	N.A.	ปานกลาง	brilliant orange yellow	pale orange yellow	-
KE1-2	ISP2	ดี	moderate orange yellow	strong orange	-
	ISP3	ดี	strong orange	vivid orange	-
	ISP4	น้อย	vivid orange yellow	vivid orange	-
	ISP5	น้อย	brilliant orange yellow	vivid orange yellow	-
	ISP6	น้อย	strong yellow	light orange yellow	-
	ISP7	น้อย	vivid yellow	moderate yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light orange yellow	vivid orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	strong yellow	strong yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	dark orange yellow	brilliant orange yellow	-
KE1-3	ISP2	ดี	deep orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP3	ดี	strong brown	light olive brown	-
	ISP4	น้อย	dark grayish reddish brown	deep brown	-
	ISP5	น้อย	strong yellowish brown	vivid orange yellow	-
	ISP6	น้อย	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	dark yellow	deep yellow	-
	Glu.A.	น้อย	dark orange yellow	moderate reddish brown	-
	Cz.sucrose	น้อย	moderate orange	moderate orange	-
	N.A.	ปานกลาง	deep yellow	pale orange yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
KE2-2	ISP2	ดี	moderate orange yellow	strong orange	-
	ISP3	น้อย	dark orange yellow	light yellowish brown	-
	ISP4	ปานกลาง	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP5	น้อย	vivid yellow	light yellow	-
	ISP6	น้อย	moderate orange yellow	moderate yellow	-
	ISP7	น้อย	dark orange yellow	strong yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light brown	moderate red	-
	Cz.sucrose	น้อย	light grayish yellowish brown	light grayish yellowish brown	-
	N.A.	น้อย	strong yellow	strong yellow	-
KE2-4	ISP2	ดี	moderate yellowish pink	moderate reddish orange	-
	ISP3	ดี	deep yellowish brown	dark yellowish brown	-
	ISP4	น้อย	dark orange yellow	light grayish yellowish brown	-
	ISP5	น้อย	moderate yellow	deep yellow	-
	ISP6	น้อย	moderate orange yellow	light orange yellow	-
	ISP7	น้อย	grayish yellowish brown	pale orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light grayish reddish brown	moderate reddish brown	-
	Cz.sucrose	น้อย	Light grayish yellowish brown	Light grayish yellowish brown	-
	N.A.	น้อย	Light grayish yellowish brown	Light grayish yellowish brown	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสโคไมซีตสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
KE2-5	ISP2	ดี	light yellowish brown	pale orange yellow	-
	ISP3	น้อย	light yellow	light yellow	-
	ISP4	น้อย	light yellowish brown	light yellowish brown	-
	ISP5	น้อย	strong yellow	brilliant yellow	-
	ISP6	น้อย	Light grayish yellowish brown	brownish pink	-
	ISP7	น้อย	deep yellow	vivid yellow	-
	Glu.A.	น้อย	strong yellow	vivid yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	brilliant orange yellow	brilliant orange yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	brilliant orange	light orange yellow	-
KK1-10	ISP2	ดี	deep yellowish brown	moderate orange yellow	-
	ISP3	ดี	dark yellowish brown	dark orange yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	light yellowish brown	light yellowish brown	-
	ISP5	น้อย	brilliant orange	brilliant orange	-
	ISP6	น้อย	light yellowish brown	light yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	moderate yellowish brown	vivid yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light olive brown	grayish yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	light yellowish brown	light yellowish brown	-
	N.A.	ปานกลาง	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสโคดิโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
KK1-11	ISP2	ดี	strong yellow	vivid yellow	-
	ISP3	น้อย	strong yellow	strong yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	strong yellow	strong yellow	-
	ISP5	น้อย	light yellow	strong yellow	-
	ISP6	น้อย	light yellowish brown	dark orange yellow	-
	ISP7	น้อย	deep orange yellow	moderate orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	moderate orange yellow	light orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	vivid yellow	moderate yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	strong yellow	strong yellow	-
KM1-1	ISP2	ดี	vivid yellow	vivid yellow	-
	ISP3	น้อย	vivid yellow	moderate yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	ISP5	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	ISP6	น้อย	vivid yellow	brilliant yellow	-
	ISP7	น้อย	strong yellow	pale yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light orange yellow	dark orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	pale yellow	pale yellow	-
	N.A.	น้อย	light orange yellow	pale orange yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสโคดิโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
KM1-2	ISP2	ดี	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP3	น้อย	brownish orange	brownish orange	-
	ISP4	ปานกลาง	vivid orange yellow	light orange yellow	-
	ISP5	น้อย	brilliant yellow	vivid yellow	-
	ISP6	น้อย	brownish orange	brilliant orange	-
	ISP7	น้อย	brownish orange	deep yellowish pink	-
	Glu.A.	น้อย	grayish reddish orange	deep orange	-
	Cz.sucrose	น้อย	grayish yellowish pink	light grayish yellowish brown	-
	N.A.	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
ZO1-7	ISP2	ดี	strong orange yellow	strong orange yellow	-
	ISP3	ดี	brownish orange	deep orange	-
	ISP4	น้อย	strong orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP5	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP6	น้อย	light yellowish pink	light yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	deep yellow	light orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	light orange yellow	light brown	-
	Cz.sucrose	น้อย	pale yellow	pale yellow	-
	N.A.	น้อย	deep yellow	pale orange yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
ZZ-H-4	ISP2	ดี	pale orange yellow	light orange yellow	-
	ISP3	น้อย	moderate yellowish brown	moderate yellowish brown	-
	ISP4	ดี	dark grayish yellowish brown	vivid orange yellow	-
	ISP5	น้อย	pale orange yellow	pale orange yellow	-
	ISP6	น้อย	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP7	น้อย	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	Glu.A.	น้อย	light yellowish brown	Deep reddish orange	-
	Cz.sucrose	น้อย	dark orange yellow	strong yellow	-
	N.A.	น้อย	dark yellow	brilliant yellow	-
ZZ1-4	ISP2	ดี	deep orange yellow	strong orange yellow	-
	ISP3	น้อย	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP4	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP5	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP6	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	ISP7	น้อย	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	Glu.A.	น้อย	deep orange yellow	deep orange yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	strong yellowish brown	light yellowish brown	-
	N.A.	ปานกลาง	deep orange yellow	light orange yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้














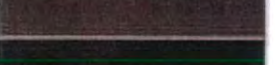







ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอสโคไมซีตสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
ZZ2-2	ISP2	ดี	strong yellowish brown	strong yellowish brown	-
	ISP3	ปานกลาง	strong yellowi	strong yellowi	-
	ISP4	ดี	dark yellow	dark yellow	-
	ISP5	ดี	moderate yellowish brown	moderate yellowish brown	-
	ISP6	ปานกลาง	strong yellow	light yellowish brown	-
	ISP7	ปานกลาง	strong yellow	strong yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	light yellow	dark grayish yellow	-
	Cz.sucrose	ดี	yellowish white	yellowish white	-
	N.A.	ปานกลาง	light grayish yellowish brown	brilliant yellow	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	#EE9D86	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	3.0r 8.7 2.1	#F1CBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.4	#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	#B12233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	4.8r 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 8.9 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	5.3r 5.8 12.1	#F64A46	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	#FEC8A8
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85

Reddish Orange, Reddish Brown

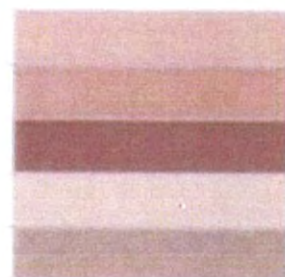
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FF9661
36 Deep Reddish Orange	9.2r 7.9 12.1	#A91D71
37 Moderate Reddish Orange	9.7r 5.5 9.2	#D35339
38 Dark Reddish Orange	9.3r 3.0 9.1	#9E2F1F
39 Grayish Reddish Orange	10.3yr 5.4 6.2	#B55D43
40 Strong Reddish Brown	10.3yr 1.4 3.9	#7F780D
41 Deep Reddish Brown	11.6yr 1.5 8.3	#493025
42 Light Reddish Brown	10.5r 5.5 4.1	#A55651
43 Moderate Reddish Brown	9.9r 5.4 5.2	#712F26
44 Dark Reddish Brown	9.2r 1.8 10.6	#321011
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.5	#966A57
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.6	#571F1C

Orange Brown

48 Vivid Orange	4.3yr 9.5 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

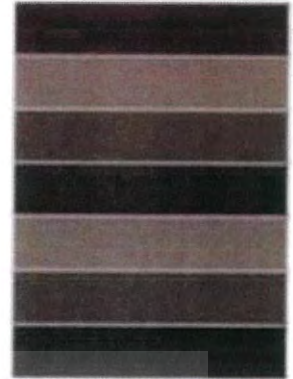
57 Light Brown 5.4yr 3.1 11.1 #C98540

58 Moderate Brown 5.6yr 1.5 11.1 #673923



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ผู้จัดทำมีให้ตัดแปลงเนื้อหาแต่ขอสงวนสิทธิ์ในสิ่งที่ปรากฏ

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	5.6yr 3.4 0.9	#503D33
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B



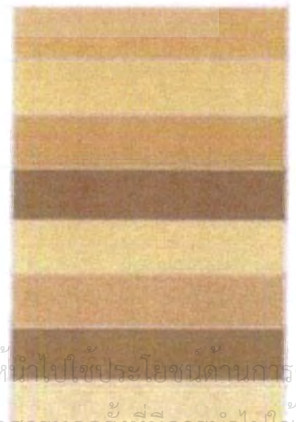
Orange Yellow, Yellowish Brown

66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.1 15.2	#FF8E00
67 Brilliant Orange Yellow	10.1a 8.1 10.5	#FFB02E
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.9 12.1	#D16E1D
70 Light Orange Yellow	10.4yr 8.3 6.8	#FFB961
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.5 8.3	#FF943C
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37829
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.1	#FFC8A6
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#955A3C
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.3 3.0	#593315
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#B88B54
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 5.4	#7B572D
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.8 3.3	#312512
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.5yr 6.4 2.5	#B45764
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.6	#785840
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F



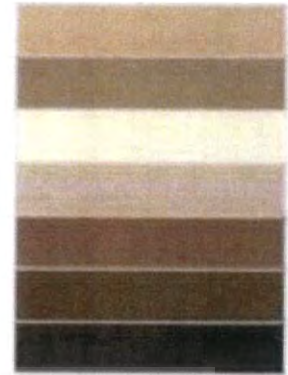
Yellow, Olive Brown

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	#FFDB6B



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 7.9	#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 4.5	#FFD684
105 Grayish Greenish Yellow	9.9y 7.2 3.9	#C4A55F
106 Light Olive	8.2y 4.1 5.6	#846A20
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#6E490F
108 Dark Olive	8.9y 2.0 3.1	#362C12
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.8 2.8	#8B734B
110 Grayish Olive	8.0y 4.6 2.0	#52442C
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B1809
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



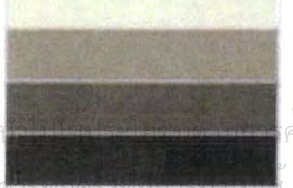
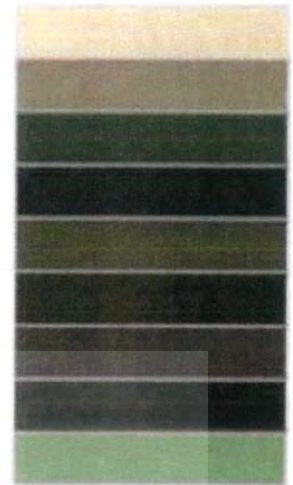
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 1.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 1.0	#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	#00341F
133 Very Deep Yellowish Green	1.0gy 1.5 1.0	#002800
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6D190
135 Light Yellowish Green	0.5g 7.4 5.2	#907BA7
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657E4B
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.8 5.0	#104B26
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.8	#132714

Green		
139 Vivid Green	3.2g 4.8 11.1	#007D34
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A
141 Strong Green	5.8g 4.4 8	#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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำเผยแพร่

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	1.5g 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	2.0bg 6.0 9.6	#009B76
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B
161 Deep Bluish Green	7.5bg 2.4 5.3	#00382B
162 Very Light Bluish Green	2.4bg 8.3 3.6	#A0D6B4
163 Light Bluish Green	0.4bg 6.5 4.9	#669E85
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556
165 Dark Bluish Green	3.9bg 2.7 5.0	#015A33
166 Very Dark Bluish Green	9.0bg 1.2 4.0	#001F18
167 Vivid Greenish Blue	5.5bg 5.0 13.0	#017BA7

Greenish Blue

168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.0 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	#A7D9C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.5	#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 7.0 6.0	#A6BDD7
181 Light Blue	1.6pb 4.4 6.9	#6C92AF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	#BAACCT
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 1.5 6.5	#424C63
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.5 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

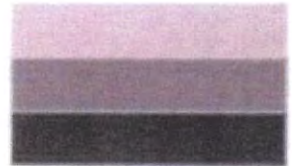
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#E8BEF1
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99

211 Moderate Violet	1.5p 3.6 7.0	#543964
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไป
 หมายความว่ากรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร

213 Very Pale Violet	9.7p 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	#E1A9BE
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.4	#71487D
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.0	#472A3F
225 Very Dark Purple	6.9p 1.1 4.5	#230D21
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 1.2	#F599BC
227 Pale Purple	7.0p 6.4 1.1	#E4849B
228 Grayish Purple	6.0p 4.5 2.5	#72523C
229 Dark Grayish Purple	6.8p 2.8 2.0	#452D35
230 Blackish Purple	6.8p 0.9 1.6	#7D1013
231 Purplish White	2.5p 9.8 0.8	#FADBC8
232 Light Purplish Gray	0.3p 5.3 1.1	#DCA99E
233 Purplish Gray	1.0p 5.5 0.9	#88708B
234 Dark Purplish Gray	1.0p 3.6 1.0	#564042
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116



Reddish Purple

236 Vivid Reddish Purple	1.0p 3.0 14.0	#7E0059
237 Strong Reddish Purple	1.3p 4.4 10.2	#9A366B
238 Deep Reddish Purple	1.0p 2.8 9.5	#641349
239 Very Deep Reddish Purple	0.9p 1.9 8.9	#470736
240 Light Reddish Purple	0.7p 6.0 6.9	#BB6C8A
241 Moderate Reddish Purple	0.8p 4.5 7.0	#8C4566



242 Dark Reddish Purple	1.3p 2.8 4.8	#4F273A
243 Very Dark Reddish Purple	1.5p 1.0 4.8	#270A1F



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้
 ใดๆ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกแห่งที่ปรากฏ

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene AN2-5 ของเชื้อไอโซเลต (1,537 นิวคลีโอไทด์)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTC
GGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGAT
AAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGA
AAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGAC
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGA
AGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCG
TCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGC
TGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA
CCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGT
CTTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAA
TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTTTTGACATACACCGGAAACANTCNGAGANN
GATGCCTCCTTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGG
GGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGT
TGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC
AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATA
CGTTCCCGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCC
GTGGCCCAACCACTTGTGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene BR3-3 ของเชื้อไอโซเลต (1,472 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACCGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTC
 CACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGAGCGGTCCAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAA
 GTCGTAACAAGGTAGCCGTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene CL1-1 ของเชื้อไอโซเลต (1,449 นิวคลีโอไทด์)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT
 ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGA
 AACCGGGTCTAATACGGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTG
 GGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
 CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
 CTCGTAGGTGGCTTGTTCGCTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACACTACGGGTCTGCGGTGGATAC
 GGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA
 GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGCTTGCTGGGCCAGTTCGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
 GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTC
 TTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCAATTAAGCGCCCEGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
 AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGATGCCTCCTTTGGACTG
 GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCG
 GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAA
 CATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGT
 CTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAA
 CACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene CL2-2 ของเชื้อไอโซเลต (1,412 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTTCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
 CACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTTGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTGGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGA
 AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene KE1-2 ของเชื้อไอโซเลต (1,446 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
 CACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTTGGGGGGGAGCGGTGCGAAAGGTGGGGCTGGCGATT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene KE1-3 ของเชื้อไอโซเลต (1,473 นิวคลีโอไทด์)

TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTA
 CTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAA
 ACCGGGTCTAATACGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGG
 GATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
 GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCG
 GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
 CGTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACCTACGGGTCTGCGGTGGATACGG
 GCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
 AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
 AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTT
 CCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCG
 AAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACATTCAGAGACAGATCCCTCCTTTGGACTGGTG
 TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGG
 TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACAT
 GCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
 CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACAC
 CCGAAGCCCGTGGCCCAACCCTTGTGGGGGGGAGCGGTGGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACG
 AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene KE2-4 ของเชื้อไอโซเลต (1,417 นิวคลีโอไทด์)

GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCC
 CTTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATA
 AGCCTGGGAAACCGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTT
 TTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGAT
 GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCG
 CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACACTACGGGTCTGC
 GGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCC
 CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGA
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTG
 TGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCG
 ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCT
 TTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
 GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGG
 GCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAA
 AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
 CAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA
 GTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene KK1-11 ของเชื้อไอโซเลต (1,482 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACCGGATACGACCATTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTGCGGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
 CACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTACATACACCGGAAACATTCAGAGACAGATCCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGA
 AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene KM1-2 ของเชื้อไอโซเลต (1,478 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACGGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTC
 CACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGATGCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCTGGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGAGCGGTGCAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAA
 GTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ZO1-7 ของเชื้อไอโซเลต (1,440 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
 CGGGTCTAATACGGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGG
 ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
 GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
 GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
 CACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGC
 AACCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
 CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
 GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
 CGAAGCCCCTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTGGAAGGTGGGGCTGGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ZZ2-2 ของเชื้อไอโซเลต (1,442 นิวคลีโอไทด์)

TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTA
 CTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAA
 ACCGGGTCTAATACGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGG
 GATGGGCTCGCGCCTATCAGATTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
 GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCG
 GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
 CGTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACACTACGGGTCTGCGGTGGATACGG
 GCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
 AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
 AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTT
 CCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGECTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCG
 AAGAACCTTACCAAGTTTTGACATACACCGGAAACATTAGAGACAGATGCCTCCTTTGGACTGGTG
 TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGG
 TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACAT
 GCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
 CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACAC
 CCGAAGCCCGTGGCCCAACCAC TTGTGGGGGGGAGCGGTGCAAGGTGGGGCTGGCG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้