



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินบริเวณ  
น้ำพุร้อน

Isolation and characterization of actinomycetes isolated from  
hot spring area soil

รศ.ดร. จิตติ ท่าไว

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การแยกและตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินบริเวณน้ำพุร้อน
(ภาษาอังกฤษ)	Isolation and characterization of actinomycetes isolated from hot spring area soil
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปี 2561	จำนวนเงิน 440,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2561
ผู้ดำเนินการวิจัย	รศ.ดร. จิตติ ทาไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 101 ไอโซเลต ถูกแยกจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดราชบุรีและระนอง ลักษณะทั่วไปของเชื้อเหล่านี้ถูกกำหนดโดยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์ห้วงควานวิวัฒนาการด้วยลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene บางส่วนพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* *Micromonospora* *Microbispora* *Planosporangium* และ *Laceyella* ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต HSS5-1 และ HSS6-8 ถูกกำหนดโดยตำแหน่งบนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าอยู่ในสกุล *Micromonospora* โดยใกล้เคียงกับเชื้อ *Micromonospora eburnea* DSM 44814<sup>T</sup> มากที่สุดที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.35 และ 98.18 ตามลำดับ ไอโซเลต BNR7-1 ก่อตัวคู่กับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* ATCC 15448<sup>T</sup> บนตำแหน่งของสายวิวัฒนาการ ที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.70 ไอโซเลต BNR8-1 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces rangoonensis* LMG 20295<sup>T</sup> มากที่สุดที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene ร้อยละ 97.61 ไอโซเลต BNR2-13-1 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Planosporangium flavigriseum* YIM 46034<sup>T</sup> มากที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap value) ที่สูงและมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 98.54 ไอโซเลต BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 มีลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene เหมือนกันซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อ *Laceyella putidus* KCTC 3666<sup>T</sup> มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.04 นอกจากนี้สารสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อตัวแทนไอโซเลต BNR8-1 และ BNR7-1 สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี

## Abstract

One hundred and one actinomycete strains were isolated from hot spring soil samples in Ratchaburi and Ranong province. The generic identities of these strains were determined by using a procedure with the combination of morphological, chemotaxonomic and partial 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analyses. Actinomycetes belonging to a total of five genera: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Planosporangium* and *Laceyella* were identified. The almost-complete 16S rRNA gene sequence of strain HSS5-1 and HSS6-8 were determined in this study and the phylogenetic position of the both strains based on the 16S rRNA gene sequence indicated that the strains were identified as the member of the genus *Micromonospora* and were most closely related to *Micromonospora eburnea* DSM 44814<sup>T</sup> (99.35 and 98.18 % 16S rRNA gene sequence similarity value, respectively). Strain BNR7-1 formed a clade with *Microbispora rosea* subsp. *aerata* ATCC 15448<sup>T</sup> in the neighbor-joining tree and shared 99.70 % 16S rRNA gene sequence similarity with this type strain. Strain BNR8-1 was close to *Streptomyces rangoonensis* LMG 20295<sup>T</sup> with 97.61% of 16S rRNA gene similarity value. Strain BNR2-13-1 was most closely associated with the genus *Planosporangium flavigriseum* YIM 46034<sup>T</sup> in the neighbor-joining analysis by a high bootstrap value and shared the highest similarity percentage of 98.54. Strains BNR8-11-5 and BNR8-11-3 had identical 16S rRNA gene sequences. These organisms were most closely associated with *Laceyella putida* KCTC 3666<sup>T</sup> (99.04% 16S rRNA gene sequence similarity value) which was supported by a high bootstrap value. Furthermore, the crude ethyl acetate extract of the fermentation broth of strains BNR8-1 and BNR7-1 exhibited the moderate anti-microbial activities.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2561 คณะ  
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงาน  
ดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. จิตติ ท่าไว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ</b>	4
2.1 เชื้อแอกติโนมัยสีท	4
2.2 การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีท	5
2.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)	5
2.2.2 ลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบภายในเซลล์	8
2.2.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)	12
2.2.4 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท	13
2.3 การแยกเพื่อคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีท	15
2.4 ประโยชน์ของเชื้อกลุ่มแอกติโนมัยสีท	15
2.5 เชื้อแอกติโนมัยสีทที่ทนความร้อน	20
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	22
3.1 อุปกรณ์	22
3.2 สารเคมี	22
3.3 วิธีการทดลอง	23
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ	23
3.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้	24

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b>	31
4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีท	31
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท	31
4.2.1 ลักษณะทางพีโนไทป์	31
4.2.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท	38
4.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนไทป์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท	42
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น	49
<b>บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	66
ภาคผนวก ง	84
ภาคผนวก จ	87
ภาคผนวก ฉ	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์และจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้	19
2.2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทหายาก	20
4.1 แสดงลักษณะดินตัวอย่างและรหัสเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้	31
4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตต่างๆ	36
4.3 การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตต่างๆ	37
4.4 ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมติกในผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท	38
4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole cell sugar)	39
4.6 แสดงองค์ประกอบของโพลาร์ลิปิด (polar lipid) จากเชื้อแต่ละไอโซเลต	40
4.7 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตต่างๆ	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ	11
2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคติโนแบคทีเรีย	13
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต HSS5-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	32
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต HSS6-8 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	32
4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR8-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	33
4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลตที่ BNR7-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	33
4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	34
4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	34
4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR8-11-3 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน และแสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	35
4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อ HSS5-1 และ HSS6-8 บน phylogenetic tree	44
4.9 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR8-1 บน phylogenetic tree	45
4.10 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR7-1 บน phylogenetic tree	46
4.11 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR2-13-1 บน phylogenetic tree	47
4.12 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 บน phylogenetic tree	48

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมนุษย์มีความต้องการหายาใหม่ เพื่อนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมาเร็ง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อที่คือคอตีบปฏิชีวนะ เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้มีการพัฒนาขบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์จนสามารถต้านยาที่ใช้กันอยู่ได้มากขึ้น ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงหันมาทำการแสวงหาวัตถุดิบหรือทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพในการผลิตยาต้นแบบชนิดใหม่เพื่อรองรับการระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์คือยา จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี ท่ามกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีตจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Bérdy, 2005) ยาปฏิชีวนะหลายตัวที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอกติโนมัยซีต เช่น Amphotericin B, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาเชื้อแอกติโนมัยซีตชนิดใหม่มีความจำเป็นอย่างมากในการเพิ่มโอกาสถึงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบตัวใหม่เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์คือยาในอนาคต ดังนั้นการศึกษาวิทยาสาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยซีตชนิดใหม่จึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรในประเทศไทย

เชื้อแอกติโนมัยซีตมักกระจายตัวอยู่ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อ แอกติโนมัยซีตในระบบนิเวศน์ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ การเพิ่มโอกาสเพื่อค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีตชนิดใหม่จึงควรเริ่มจากการศึกษาแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่มีลักษณะทางระบบนิเวศน์แตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป น้ำพุร้อนจัดเป็นแหล่งธรรมชาติที่น่าสนใจเนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่เป็นเอกลักษณ์และแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป โดยมากมักพบอยู่ในแหล่งป่าธรรมชาติที่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงน่าจะมีการหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์สูงและแสดงลักษณะจำเพาะที่โดดเด่นต่างไปจากจุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีตในบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาศึกษาการกระจายตัว อนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีตตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหายาจากเชื้อแยกได้นั้น การศึกษาวิยนี้ อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีตชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสติโนมัยซีท ช่วยเพิ่มขีดความสามารถ ทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยก ศึกษาการกระจายตัว และตรวจสอบคุณลักษณะของแอสติโนมัยซีทจากดินบริเวณน้ำพุร้อนของไทย ตลอดจนคัดเลือกเชื้อแอสติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกลุ่มแอสติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา เช่น Methicillin resistant

*Staphylococcus aureus*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและหลักการ

### 2.1 เชื้อแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในอันดับ *Actinomycetales* พบอยู่ทั่วไปในแหล่งดิน แหล่งน้ำ ปุ๋ยหมัก พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว เจริญได้ในดินที่เป็นกลางหรือเป็นด่างมากกว่าในดินที่เป็นกรด เชื้อชนิดนี้ในธรรมชาติมีบทบาทสำคัญคือ ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์สารหลายชนิดและมีความสำคัญทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม โดยสามารถนำมาผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ วิตามิน เอนไซม์ เป็นต้น เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต่อต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Goodfellow และคณะ, 1988)

แอกติโนมัยสีทสามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ ในบางตระกูลสายเซลล์จะพัฒนาเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเล็กกว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของสายเซลล์ประมาณ 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ ซึ่งในบางตระกูลจะพบการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหาร (aerial hypha) และ/หรือเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร (substrate hypha) ในลักษณะเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายที่มีจำนวนสปอร์ต่างๆกัน สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวงหรือขดเป็นเกลียว และสายสปอร์อาจเกิดเดี่ยวๆจากเส้นใยหรือเกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย (verticillate) บางสกุลมีสปอร์เกิดอยู่ภายใน sporangium (Buchanan และ Gibbons, 1974)

แอกติโนมัยสีทจัดเป็นแบคทีเรีย เพราะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) (Cross และ Goodfellow, 1973) ผนังเซลล์ประกอบด้วย mucopeptide (N - acetyl glucosamine เชื่อมกับ N - acetyl muramic acid) ; L -2,6 -diaminopimelic acid ; glutamic acid ; glycine และ alanine (Davis, 1959; Waksman และ Henrici, 1974) ในแอกติโนมัยสีทแต่ละกลุ่มยังมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น รูปแบบของน้ำตาล ซึ่งใช้เป็นหลักในการจำแนกจีสของเชื้อแอกติโนมัยสีท (Yamaguchi, 1965; Buchanan และ Gibbons, 1974; Davis, 1959) โดยปกติแบคทีเรียใน Order นี้ย้อมติดสีแกรมบวก ยกเว้นพวก mycobacteria จะเป็น acid - fast และสมาชิกบางตัวในตระกูล Nocardiaceae เป็น weakly - acid - fast ส่วนใหญ่เป็น aerobe ยกเว้นบางสกุลในตระกูล Actinomycetaceae ที่อาจจะเป็น anaerobe, facultative หรือ aerobe

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แอกติโนมัยสิทจำแนกจากประเภทของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ ไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ เปปติโดไกลแคนในแอกติโนมัยสิทแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ กลุ่ม B กลุ่ม A เป็นการเชื่อมสายกรด *N*-acetylmuramic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 3 กับที่ 4 และกลุ่ม B เชื่อมตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2 กับ 4 ส่วนกรดอะมิโนหลักที่ผนังเซลล์แบ่งเป็นหลายประเภท ส่วนใหญ่เป็นกรดไดอะมิโนปิมีลิก (diaminopimelic acid ; DAP) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ *LL* - DAP และ *meso* - DAP สำหรับองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมัน แบ่งกรดไขมันฟอสโฟลิปิด (มี 5 ประเภทคือ PI - PV) (Goodfellow และ O' Donnell, 1993) และอนุพันธ์ของมีนาควิโนน (menaquinone) ประเภทต่างๆ สำหรับน้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนส กาแลคโตส มาควิโรส และไซโลส เป็นส่วนใหญ่

## 2.2 การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสิท

สามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ของเชื้อ ดังนี้

### 2.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)

เป็นลักษณะต่างๆ ที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญชีวิตเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ ลักษณะทางฟีโนไทป์นี้เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนซึ่งมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอกติโนมัยสิทนั้นมีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียทั่วไป ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ศึกษาได้แก่

#### 2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสิทนั้นสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้โดยอาศัยการศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ เส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยสิทมี 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยอากาศซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างชูขึ้นไปบนอากาศ และเส้นใยอาหารซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างแทงลงบนผิวหน้าอาหาร มีหน้าที่ในการดูดซึมอาหารมาเลี้ยงส่วนต่างๆของเซลล์เชื้อแอกติโนมัยสิทส่วนใหญ่มักสร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด แต่มีบางชนิดไม่สร้างเส้นใยอากาศ เช่น เชื้อสกุล *Micromonospora* เป็นต้น สปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยสิทแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สปอร์เปลือย (naked spore) เช่น โคนิเดียม (conidia) และสปอร์ที่อยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) เช่น สปอร์แรงจิโอ-สปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อสามารถใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสิทได้เช่นกันลักษณะการสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยสิท สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี อยู่ภายใน cytoplasm ของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic actinomycetes เช่น *Thermoactinomyces* ส่วน

*Actinobifida* และ *exogenous formation* แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ *exogenous* โดยเฉพาะ *Streptomyces spp.*

Vobis (1997) ได้อธิบายไว้ในหนังสือ *Atlas of Actinomycetes* เกี่ยวกับลักษณะของสปอร์ไว้ดังนี้

### 1. สปอร์แบบเดี่ยว (single spore)

กลุ่มที่ผลิตสปอร์เดี่ยวเรียกว่า “monosporous” เช่น ลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุล *Micromonospora* มีก้านชูสปอร์เกิดบริเวณเส้นใยอาหาร สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น การเกิดสปอร์เริ่มจากการโป่งพองบริเวณปลายของเส้นใยลงมาถึงผนังกั้นจนมีการพองตัวเป็นผนังสปอร์ เชื้อสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ บริเวณปลายเส้นใยอาจมีหรือไม่มีการแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์ เชื้อสกุล *Saccharomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวมีการพัฒนาบนเส้นใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกกิ่งก้าน ลักษณะของสปอร์เป็นวงรีอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น

### 2. สปอร์มีลักษณะเรียงตัวเป็นเส้นสาย (spores formed in chains)

สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสายเกิดการแบ่งแยกตามขวางของผนัง การแบ่งผนังส่วนนี้ทำให้มีการเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ ลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้จำแนกลักษณะรูปร่างตามความยาวหรือจำนวนของสปอร์ที่แบ่งได้ เช่น *disporous* หรือ *bisporous* หมายถึงสปอร์แบบคู่ *oligosporous* หมายถึงสปอร์จำนวนเล็กน้อยและ *polysporous* หมายถึงสปอร์จำนวนมากกว่า 2 ขึ้นไป

สปอร์แบบคู่ (*disporous*) ประกอบด้วยสปอร์ที่อยู่เป็นคู่ตามยาว ได้แก่ เชื้อสกุล *Microbispora* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ขนาด 2 ไมโครเมตร และมีชั้นที่หนาเป็น 3 ถึง 4 เท่าของเส้นใยโคโลนี ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นมาก การเกิดของสปอร์ในช่วงแรกเกิดจากการแยกตัวออกตามความยาวจากเส้นใยอากาศทำให้เกิดเป็นกิ่งก้านสั้นๆ ทางด้านข้างทำให้เกิดการโป่งพองและสร้างผนังกั้นตามแนวขวาง

แอคติโนมัยซีทที่มีสปอร์จำนวนเล็กน้อย (*oligosporous*) มีการพัฒนาของสปอร์บนสายสั้นๆ ในแต่ละสายจะมีสปอร์อยู่ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ หรือน้อยที่สุดคือมี 3 สปอร์ ก้านชูสปอร์และสปอร์อาจแตกกิ่งก้านได้และเส้นใยอาจมีการหักเป็นท่อนๆ เชื้อสกุล *Nocardia* มีสปอร์ 2 ถึง 7 สปอร์บนก้านชูที่มีขนาดสั้น เชื้อสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* เส้นสายของสปอร์มีขนาดสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศ โดยปกติ *Actinomadura* มีจำนวนสปอร์มาก 10 ถึง 20 สปอร์บนสายเดียวกันเส้นใยอาจมีลักษณะตรง โค้งงอ หรือเป็นเกลียวได้ เช่น เส้นสายสปอร์ของเชื้อ *Actinomadura pusilla* มีลักษณะค่อนข้างหนาและเป็นเกลียว เชื้อในกลุ่มนี้มีสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสปอแรงเจียของเชื้อสกุล *Streptosporangium* เรียกว่า ชูโคสปอแรงเจีย

(pseudosporangia) ลักษณะของสปอร์สายสั้นสามารถสังเกตได้จากเชื้อ *Sporichthya polymorpha* เส้นใยอากาศจะเกิดการแบ่งตัวจากรูปท่อนเป็นสปอร์ที่มีลักษณะกลม

กลุ่มของแอกติโนมัยสีทที่มีสปอร์จำนวนมาก (polysporus) ได้แก่ เชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการพORMรูปเป็นเส้นสายที่ยาวและมีมากกว่า 50 สปอร์ลักษณะรูปร่างของสปอร์ในแต่ละสปีชีส์ของสเตรปโตมัยสีทจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปหลายรูปแบบ

3. อับสปอร์ที่อยู่ภายในถุงบรรจุสปอร์หรือสปอแรงเจีย (spores formed within sporangia)

สปอร์ถูกหุ้มด้วยสปอแรงเจียซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้ม สปอร์มีการพัฒนาและห่อหุ้มจนกระทั่งสปอร์แก่จึงมีการปล่อยสปอร์ออกมาจากถุงหุ้ม สปอแรงเจียมีรูปร่างต่างๆ ได้หลายอย่าง เช่น รูปร่างกระบอก รูปร่างคล้ายหลอดหรือท่อ รูปร่างคล้ายขวด รูปร่างคล้ายร่ม หรือรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์มีขนาด 2 ถึง 50 ไมโครเมตร แต่โดยส่วนใหญ่จะมีขนาด 10 ไมโครเมตร

#### 4. โครงสร้างอื่นๆ

แอกติโนมัยสีทบางชนิดมีลักษณะรูปร่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมากบางชนิดอาจมีผนังที่หนาหรือมีรูปร่างเป็นทรงกลม บางชนิดสร้างสปอร์บริเวณแกนเส้นใย

##### 2.2.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

##### 1. คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน

เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งในการแยกเชื้อเนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบ คือ

ก. โคแอกกูเลชัน (coagulation) เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้จะปรากฏลักษณะให้เห็นคืออาหารมีการรวมกลุ่มหรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

ข. เปปโตไนเซชัน (peptonization) หากมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้นลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

##### 2. คุณสมบัติในการย่อยเจลาติน (gelatin)

ความสามารถในการย่อยหรือทำให้เจลาตินเหลวมีประโยชน์ในการดูความแตกต่างของสปีชีส์และชนิดของแบคทีเรีย เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียย่อยเจลาตินโดยใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เมื่อถูกย่อยเจลาตินจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจลซึ่งจะเป็นของเหลวถึงแม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการทดสอบ (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

##### 3. คุณสมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสลายตัวของไนเตรต เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต( $KNO_3$ ) สามารถทดสอบได้โดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟาแนปทิลลามีน ( $\alpha$ -naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิกและไนเตรต จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) จะรวมตัวกับแนปทิลลามีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye)

#### 4. คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อ ซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกทิน (amylopectin) เมื่อต้มแป้งอะไมโลส จะละลายแต่อะไมโลเพกทินจะไม่ละลาย ทั้งอะไมโลส และอะไมโลเพกทิน มีองค์ประกอบคือน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ในอะไมโลส (amylose) น้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4- $\alpha$ -glucosidic ส่วนอะไมโลเพกทิน (amylopectin) มีทั้งพันธะ 1,4- $\alpha$ -glucosidic และพันธะ 1,6- $\alpha$ -glucosidic (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

การทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรียใช้สารละลายไอโอดีนหยดลงบนผิวอาหาร และถ้าเกิดสีแดงถึงสีม่วงบนผิวอาหารแสดงว่าแป้งไม่ถูกย่อยแต่ถ้าไม่ปรากฏสีบนผิวอาหารแสดงว่าบริเวณนั้นมีการย่อยแป้ง

#### 5. คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เป็นด่าง แต่มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ดังนั้นในการทดสอบคุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่างจึงเป็นการจัดจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น

#### 6. ความสามารถในการทนเกลือ

ในการทดสอบความสามารถในการทนเกลือของเชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเจริญในสภาวะที่มีระดับเกลือต่างๆ รวมทั้งสามารถบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆ ได้ด้วย

#### 7. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ้าดูจากอุณหภูมิสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 3 พวก คือพวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูงเรียกว่า thermophilic bacteria ถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำเรียกว่า psychrophilic bacteria (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ดังนั้น ในการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันนี้จึงสามารถช่วยในจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีทได้เช่นกัน

### 2.2.2 ลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบภายในเซลล์ (chemotaxonomic characteristics)

#### 2.2.2.1 ลักษณะกรดไดอะมิโนพิมลิกของผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติก เป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่งในการวิเคราะห์ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งแอกติโนมัยซีท ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกสามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์จากเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกถูกแยกออกโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือโครมาโตกราฟีชนิดชั้นบางซึ่งมีเซลลูโลสเป็นเฟสคงที่ (Komagata และ Suzuki, 1987) ชนิดของกรดไดอะมิโนพีเมติกที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น LL-DAP และ meso-DAP

แอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* จะมีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกแบบ LL-DAP จัดเป็นแอกติโนมัยซีททั่วไป (common actinomycetes) แอกติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) มีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกแบบ meso-DAP นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนมัยซีทบางสกุล เช่น *Kitasatospora* นั้นมีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกทั้งสองแบบคือ LL-DAP และ meso-DAP

#### 2.2.2.2 ลักษณะน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลบางชนิดในเปปติโดไกลแคน อาจมีกลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมูรามิก (muramic acid) เพิ่มเติมขึ้นมา ซึ่งส่วนประกอบน้ำตาลที่มีบนผนังเซลล์มีประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดและการพิสูจน์สายพันธุ์ของแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและแอกติโนมัยซีท ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบในเซลล์ ช่วยให้สามารถจำแนกชนิดของลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ที่กำหนดไว้โดย Lechevalier และคณะ (1971)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลบางชนิดอยู่ในส่วนของกลูโคซามีนและกรดมูรามิกในชั้นเปปติโดไกลแคน ตำแหน่งของน้ำตาลถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกและแอกติโนมัยซีท แต่แบคทีเรียบางชนิดก็ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลที่แน่นอน (Komagata และ Suzuki, 1987)

ตัวอย่างของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์ ได้แก่ น้ำตาลไซโลส (xylose) น้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลแรมนโนส (rhamnose) น้ำตาลแมนโนส (mannose) น้ำตาลไรโบส (ribose) น้ำตาลมาดูโรส (madurose) และ น้ำตาลกลูโคส (glucose) จากลักษณะที่จำเพาะของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์นี้ สามารถจัดรูปแบบของน้ำตาลในเซลล์ได้เป็น 4 รูปแบบ (ซาญูวิทซ์ สุริยฉัตรกุล, 2546) ได้แก่ ชนิด A ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบินโนสและกาแลคโตสเป็น น้ำตาลหลัก ชนิด B ประกอบด้วยน้ำตาลมาดูโรสเป็นน้ำตาหลัก ชนิด C เป็นกลุ่มที่ไม่มีรูปแบบ ของน้ำตาลเฉพาะ และชนิด D ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

#### 2.2.2.3 ลักษณะของโพลาร์ลิพิด (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ ฟอสโฟลิปิดแสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ในโมเลกุล (Komagata และ Suzuki, 1987)

ฟอสโฟลิปิด ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญ มีดังต่อไปนี้

PA	=	Phosphatidic acid
PC	=	Phosphatidylcholine
PE	=	Phosphatidylethanolamine
PS	=	Phosphatidylserine
PI	=	Phosphatidylinositol
PIMs	=	Phosphatidylinositolmannosides
PG	=	Phosphatidylglycerol
DPG	=	Diphosphatidylglycerol
GluNu	=	An unknown structure containing glucosamine

Lechevalier และคณะ (1981) ได้จัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ดังนี้

PI ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดแทบทุกชนิดยกเว้น phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE), OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylcholine (PC) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)

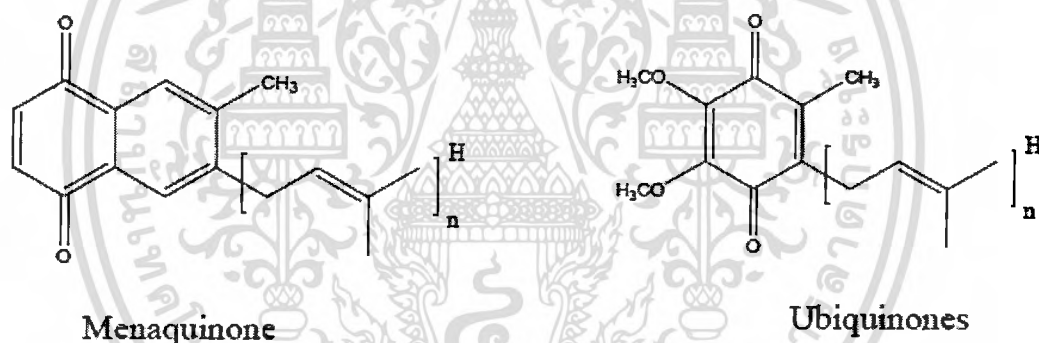
PII ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE) และ OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE) เป็นหลัก แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIII ประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) เป็นหลัก อาจจะมีหรือไม่มี phosphatidylethanolamine (PE) แต่ไม่มีฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIV ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE) และ ฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

#### 2.2.2.4 ลักษณะไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต พบไอโซพรีนอยด์ เมนาควิโนน และหรือไอโซพรีนอยด์ยิบิควิโนน (รูปที่ 2.1) แบคทีเรียบางชนิดพบ naphthoquinones เช่น chlorobium quinone พบจาก *Chlorobium thiosulphatophilum* นอกจากนี้จำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene) และระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในสายของไอโซพรีนิล (isoprenyl) ก็เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณหน่วยของไอโซพรีนมักใช้ high-performance liquid chromatography (HPLC) และ reverse-phase thin-layer chromatography ในการวิเคราะห์ (Komagata และ Suzuki, 1987)



รูปที่ 2.1 แสดง ไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ  
ที่มา : Komagata และ Suzuki, 1987

#### 2.2.2.5 กรดมัยคอลลิก (Mycolic acid)

กรดมัยคอลลิกมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของ  $\beta$ -hydroxyl และ  $\alpha$ -branched พบใน *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, และ *Corynebacterium* กรดมัยคอลลิกประกอบด้วยคาร์บอน 70-90 อะตอม ใน 1 กิ่งจะประกอบด้วย 24 คาร์บอน ในสายโซ่แต่ละสายมีตำแหน่งซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จัดจำแนกลักษณะของกรดมัยคอลลิก ผันงเซลล์ของแบคทีเรียที่มีกรดมัยคอลลิกเป็นองค์ประกอบพบว่ามีกรดมัยคอลลิกหลายชนิด เช่น ไกลโคไลปิด (glycolipids), ฟีนอลิก ไกลโคไลปิด (phenolic glycolipids) หรือไกลโคเปปติโดไลปิด (glycopeptidolipids) (Liu และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williams และคณะ (1989) ทำการจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในระดับสกุลและสปีชีส์ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics) เช่น ลักษณะของผนังเซลล์ (cell wall chemotype) ชนิดของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์ (Whole-cell sugar) ชนิดของฟอสโฟลิปิด (phospholipid type) ตลอดจนชนิดของกรดไดอะมิโน-พิเมลิก (diaminopimelic acid type, DAP) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ ลักษณะความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA) (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในยีนช่วง 16S rDNA และ RFLP (restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบชีวสารสนเทศ (bioinformatic) มาเพื่อช่วยตัดสินใจการจำแนกอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

### 2.2.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

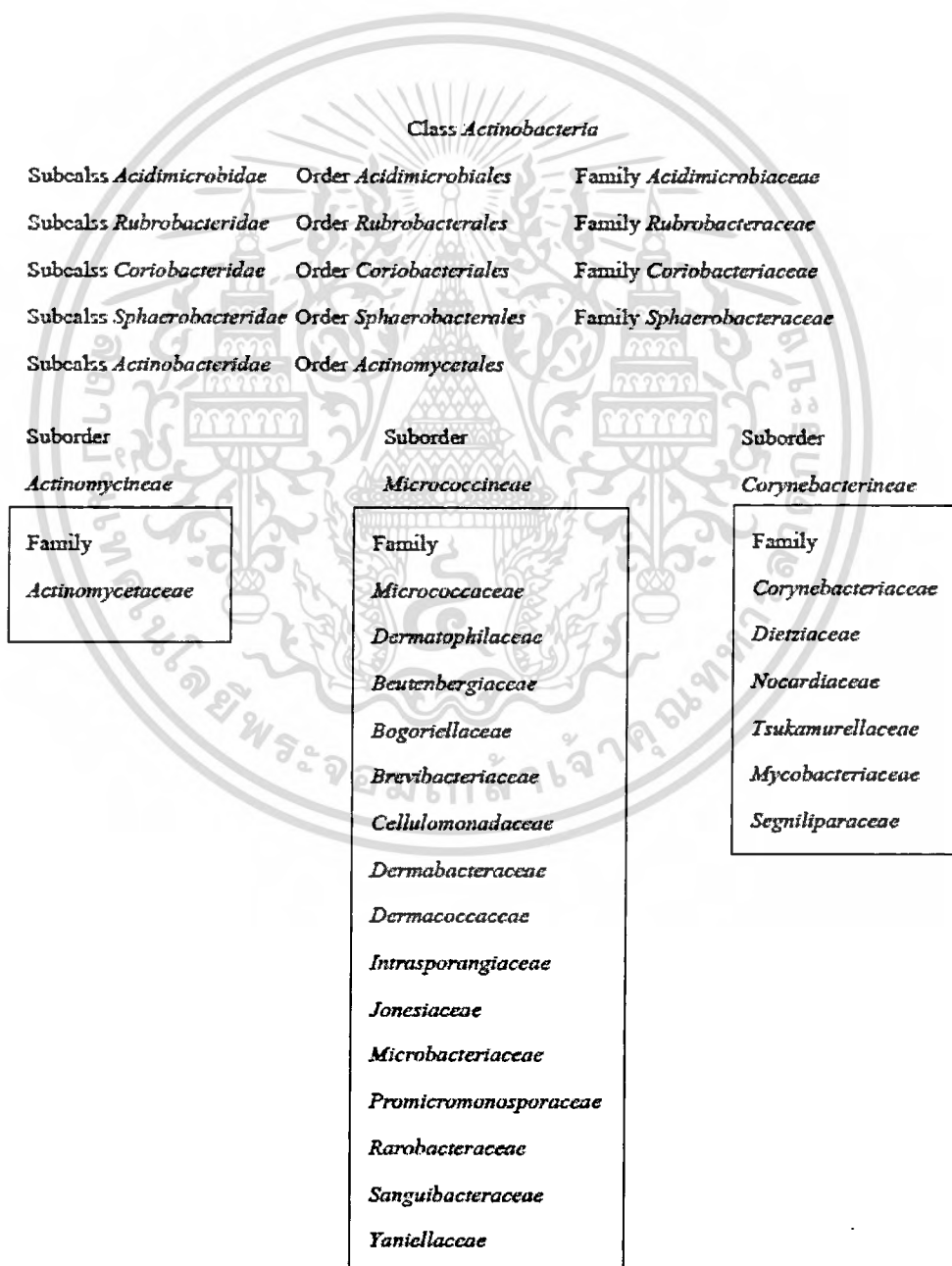
เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ คือศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา การศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอ มักศึกษาลำดับเบสของยีนในช่วงต่างๆ ยีนในช่วง 16S rDNA เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยีน 16S rDNA เป็นช่วงยีนบนสายดีเอ็นเอที่มีรหัสสำหรับการสร้างไรโบโซมถูกเลือกนำมาใช้เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด เป็นเหมือนยีนลายเซ็น (signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของ 16S rDNA ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือยีน 16S rDNA จะมีช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสช่วงนั้นเหมือนกันในทุกแบคทีเรีย ในขณะที่ยีน 16S rDNA ก็มีช่วงที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ดังนี้

ช่วงที่เหมือนกันจะนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ่ (PCR amplification) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) คือไพรเมอร์นี้สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ได้จากแบคทีเรียแทบทุกชนิด

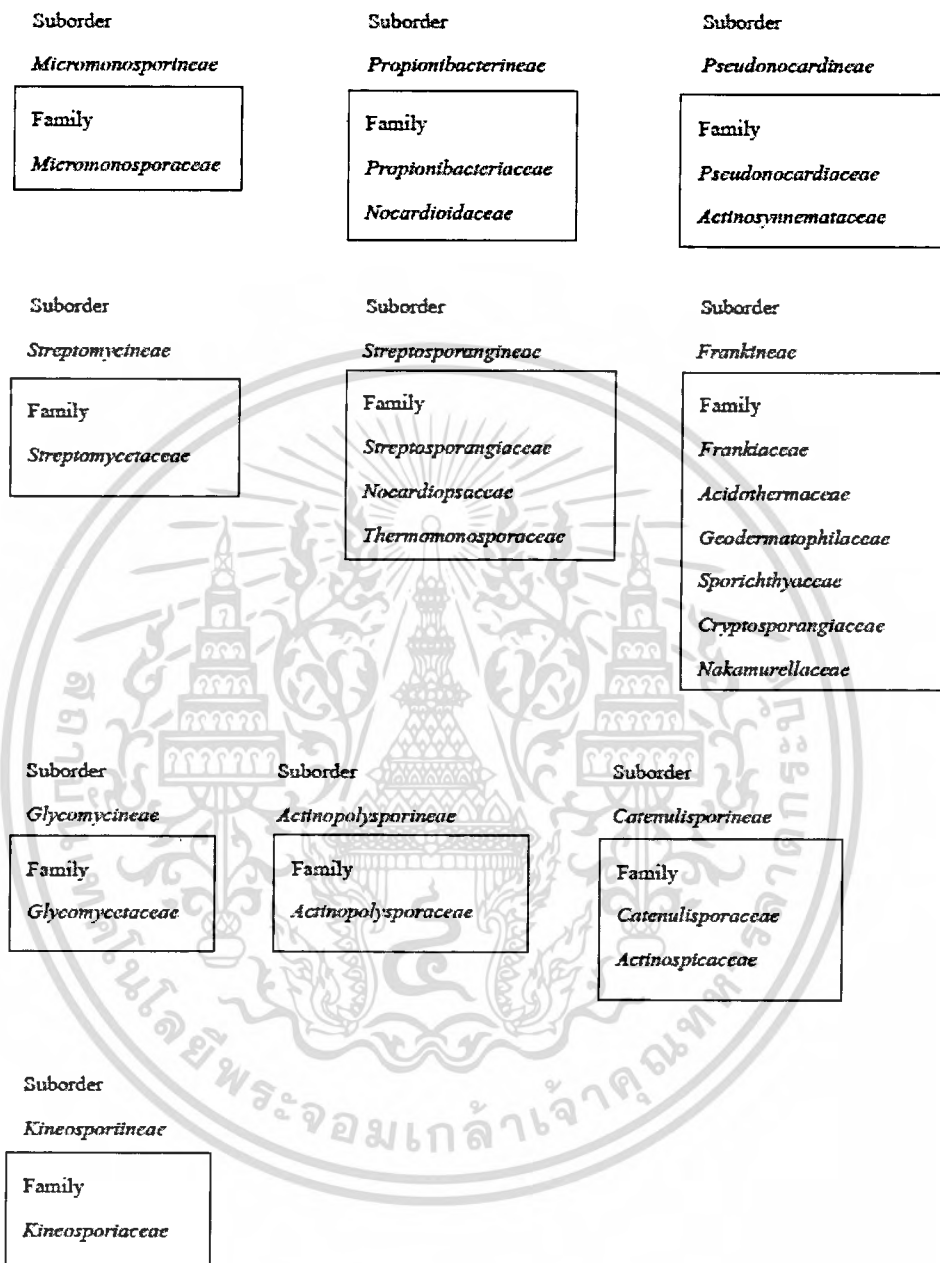
ในช่วงของยีน 16S rDNA ที่มีความแตกต่างในแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสกุลและสปีชีส์ได้โดยการนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อดูความคล้ายคลึงกันและสร้าง phylogenetic tree ซึ่งสามารถบอกสายวิวัฒนาการได้ (ไพร์ตัน สงทอง, 2551)

#### 2.2.4 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีย

Stackebrandt และคณะ (1997) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์และลักษณะทางจีโนมไทป์ในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอกติโนแบคทีเรีย โดยสามารถจำแนกได้เป็น 5 คลาสย่อย 5 อันดับ 10 อันดับย่อย 30 วงศ์ และ 95 สกุล และต่อมา Zhi และคณะ (2009) ได้ปรับระบบของการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสียให้เป็น ปัจจุบัน ดังรูปที่ 2.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
รูปที่ 2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอกติโนแบคทีเรีย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Subclass: *Actinobacteridae*    Order: *Bifidobacteriales*    Family: *Bifidobacteriaceae*

## รูปที่ 2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคทีโนแบคทีเรีย (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การแยกเพื่อคัดเลือกรเชื้อแอกติโนมัยสีท

การแยกเพื่อคัดเลือกรเชื้อแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินให้ได้ผลดีขึ้น จะต้องกำจัดหรือจำกัดการเจริญของเชื้อรา และการกระจายของแบคทีเรียในอาหารที่ใช้แยก ซึ่งอาจทำได้โดยการควบคุมองค์ประกอบของอาหาร เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในตัวอย่างดินก่อนที่จะนำมาแยกเชื้อ (Porter, 1971) องค์ประกอบของอาหารที่ควบคุมเพื่อให้เชื้อแอกติโนมัยสีทเจริญได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง กลีเซอรอล และแหล่งไนโตรเจน เช่น casein asparagines และ arginine เป็นต้น (EI – Nakeeb และ Lechavalier, 1963) พบว่าการแยก *Streptomyces* จากปุ๋ยหมักโดยใช้ starch casein agar ทำให้เชื้อเจริญได้ดี (Kuster และ William, 1964) การป้องกันและลดจำนวนเชื้อราทำได้โดยเติมสารยับยั้งการเจริญบางอย่างลงไป เช่น sodium propionate 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Crook และคณะ, 1950)

Lawrence (1956) ลดการปะปนของเชื้อราและแบคทีเรียในตัวอย่างดินก่อนจะนำไปแยกเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยการเติมสารฟีนอลที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 400 ลงในตัวอย่างดินนาน 10 นาที การนำสารละลายดินไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 1,690 g นาน 20 นาที จะทำให้จุลินทรีย์อื่นๆ ตกตะกอนยกเว้นแอกติโนมัยสีท (Rechacek, 1971) ในปริมาณ 350 มิลลิกรัมต่ออาหาร rose bengal 1 ลิตร จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการกระจายของเชื้อราได้เช่นเดียวกัน (Ottow, 1972)

## 2.4 ประโยชน์ของเชื้อกลุ่มแอกติโนมัยสีท

ปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดจากเชื้อแอกติโนมัยสีทอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้พัฒนาตัวเองจนสามารถคือยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากขึ้น ในจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่าแอกติโนมัยสีทเป็นกลุ่มที่มีความน่าสนใจมากที่สุด โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* (ตารางที่ 2.1) จัดเป็นแหล่งผลิตยาปฏิชีวนะแหล่งใหญ่ (Boudiella และคณะ, 2006) เนื่องจากค้นพบได้ง่ายและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อเกิดขึ้นในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็น family หรือ series ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่มักจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) โดยการเพาะเชื้อในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture (vegetative) ลงในอาหาร ในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัว และมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration

phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยนวิถีชีวเคมี (biochemical pathway) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา (Isaac และ Jennings, 1995)

หากจำแนกแอกติโนมัยซีทตามสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะ กลุ่มที่สร้างได้มากที่สุด 3 กลุ่มใหญ่คือ *Streptomyces*, *Actinoplanetes* และ *Nocardioform* (Okami และ Hotta, 1988)

*Streptomyces* จัดเป็นสมาชิกสกุลสำคัญ มีมากถึงร้อยละ 90 ของแอกติโนมัยซีททั้งหมด องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ประกอบด้วย เปปติโดไกลแคนชนิด A ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย N - acetylmuramic acid เป็น LL - DAP มีฟอสโฟลิปิดประเภท II (PII type) คือ ประกอบด้วย phosphatidylinositol และ phosphatidylethanolamine อนุพันธ์ของมินาควิโนน MK - 9 (H<sub>9</sub>) และน้ำตาลภายในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนส กาแลคโตส และไซโลส (Williams และคณะ, 1989) ลักษณะของ *Streptomyces* เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงไปใต้น้ำและสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งสร้างสปอร์ เป็นสายสปอร์รูปแบบต่างๆ ได้แก่ สายสปอร์แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบรูป (retinaculiaperiti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) ผิวโคโลนีที่เห็นจะมีลักษณะเรียบหรือขรุขระ มีหลายสีได้แก่ ขาว เทา เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่าง โคโลนีมีเส้นใยอาหารเป็นสีน้ำตาลส่วนใหญ่ แต่อาจพบสีอื่นๆเช่นเดียวกับสีสปอร์ได้ *Streptomyces* สามารถสร้างรงควัตถุเมลานินและรงควัตถุอื่นที่ละลายออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้เป็นกฎเกณฑ์ในการจำแนก *Streptomyces* ออกจากแอกติโนมัยซีทตระกูลอื่นได้ (Sherling และ Gottlieb, 1996) นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (trans - 1, 10 - dimethyl decalol) ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 - 8.0 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้หลายประเภทเช่น กลูโคส กลีเซอรอล และเปปโติน เป็นต้น มักจะทนเค็มได้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ขึ้นไป บางชนิดอาจทนเค็มได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* จำเป็นต้องอาศัยแร่ธาตุบางชนิดได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น (Williams และคณะ, 1989)

*Streptomyces* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายประเภท ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin), เพนนิซิลลิน (penicillin - N) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (beta - lactam ring) ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่วนสารซึ่งมีสมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ nystatin, polyoxin และ anthracycline เป็นต้น nystatin มีโครงสร้างเป็น polyene มีสมบัติฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด (broad - spectrum fungicide) สำหรับ polyoxin มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา ส่วน anthracycline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งด้วย โดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ในเชื้อราทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้

นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังสามารถสร้างสารฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์กว้าง ได้แก่ สารในกลุ่ม macrolide เช่น avermectin สารฆ่าวัชพืช เช่น phosphinothricin สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) เช่น rapamycin และสารต่อต้านมะเร็ง เช่น limocrocic ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค สำหรับ *Streptomyces* ที่เป็นสาเหตุก่อโรค พบเพียงเล็กน้อย เช่น *S. scabies* ก่อโรค potato scab, *S. somaliensis* ก่อโรค actinomycetoma ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ *S. albus* ก่อโรคหอบหืดในคน เป็นต้น (Goodfellow และคณะ, 1988)

แอกติโนมัยซีทกลุ่ม *Actinoplanes* สกุลที่สร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุดคือ *Micromonospora* ผนังเซลล์ของเชื้อสกุลนี้ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนประเภท A โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย N – acetylmuraminic acid เป็น meso – DAP มีฟอสโฟลิปิดแบบ PII และอนุพันธ์ของมีนาควิโนนเป็นแบบ MK – 9 (H<sub>4</sub>), MK – 10 (H<sub>6</sub>) โดยน้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนสกับไซโลส (Kawamoto, 1989) *Micromonospora* ที่เจริญบนอาหารแข็งสร้างโคโลนีขนาดเล็กซึ่งเป็นส่วนของเส้นใยอาหารมีทั้งโคโลนีสีส้ม แดง ดำ น้ำตาล เขียว และม่วง แต่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ อาจพบการสร้างสปอร์อยู่ที่ผิวของโคโลนี เห็นเป็นสีดำและเป็นเมือก จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อาจสร้างรงควัตถุสีเหลือง แดง ม่วง หรือดำในอาหารแข็งได้ สปอร์ของ *Micromonospora* ทนความร้อนและความเย็นได้ดี เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 – 40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่พีเอชต่ำกว่า 6 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น เจนตาไมซิน (gentamicin) (Kawamoto, 1989)

แอกติโนมัยซีทกลุ่ม nocardioform ที่สำคัญคือ *Nocardia* และ *Rhodococcus* ผนังเซลล์ของเชื้อสกุลนี้ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนประเภท A ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย ของสาย N – acetylmuraminic acid เป็น meso – DAP มีฟอสโฟลิปิดแบบ PII และอนุพันธ์ของมีนาควิโนนเป็นแบบ MK – 8 (H<sub>2</sub>), MK – 8 (H<sub>4</sub>) หรือ MK – 9 (H<sub>2</sub>) และยังมีกรดไมโคลิก (mycolic acid) เป็นองค์ประกอบของเซลล์ประกอบด้วยอะราบิโนสและกาแลคโตส (Goodfellow, 1989) ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งของ *Rhodococcus* สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร บางช่วงในการเจริญของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนหรือทรงกลม โคโลนีมีได้หลายสี เช่น แดง เหลือง ส้ม ชมพู ครีม น้ำตาล และม่วง มีทั้งผิวเรียบและขรุขระ *Rhodococcus* หลายชนิดสร้างเมือกที่ผิวโคโลนี เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่สร้างสปอร์ nocardioform ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น nocardicin สารต่อต้านไวรัส เช่น sakomycin A นอกจากนี้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และเอนไซม์ย่อยสลายอินทรีย์สาร เช่น ฟาง ยาง พลาสติก สารไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น (Czoch, 1988 ; Goodfellow และคณะ, 1988)

อานันท์ (2551) ได้เขียนบทความในหัวข้อ บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในการเกษตรไว้ว่า เชื้อแอกติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างสาร actinomycin และ aureomycin ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อโรคต่างๆ

การค้นพบสารปฏิชีวนะแหล่งใหม่จากแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่นๆ ที่ไม่ใช่สกุล *streptomyces* มีเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างของสารทุติยภูมิที่สร้าง ได้แก่

vancomycin และ rifamycin ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุล *Amycolatopsis*

erythromycin และสารที่มีฤทธิ์ต้านโรคติดเชื้อในปอด (farmer's lung disease) ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุล *Saccharopolyspora*

aminoglycoside, gentamicin และ astromicin ผลิตได้จากเชื้อสกุล *Micromonospora*

rifamycin O และ rifamycin S ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Thermomonospora formosensis*

benanomicin และ esperamicin ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุล *Actinomadura* (Miyadoh, 1997)

นอกเหนือจากเชื้อแอกติโนมัยสีทจะมีประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว ยังมีบทบาทในด้านอื่นอีกมากมาย เช่น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงดินโดยแอกติโนมัยสีทจะสังเคราะห์อินทรีย์สารในดินให้เป็นน้ำตาลและสังเคราะห์กรดอะมิโน เป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยหมัก กระตุ้นให้ *Azotobactor* และ *Mycorrhiza* ในดินทำงานได้ดีขึ้น ลดอัตราการพังทลายของหน้าดินทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อราที่ไม่มีประโยชน์และพวก anaerobic bacteria จึงสามารถเปลี่ยนดินที่มีเชื้อโรคให้หมดสภาพไปทำให้ลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช นอกจากนี้ยังช่วยสลายเปลือกเมล็ดพืชทำให้งอกเร็วขึ้น รวมถึงใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (เกรียงไกร และคณะ, 2539)

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์และจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้

ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ (ชนิด)
<b>เชื้อรา</b>	
<i>Phycomycetes</i>	14
<i>Ascomycetes</i>	299
<i>Penicillium</i>	123
<i>Aspergillus</i>	115
<i>Basidiomycetes</i>	140
Imperfect fungi	315
<b>แบคทีเรีย</b>	
<i>Pseudomonas</i>	171
<i>Enterobacteria</i>	36
<i>Micrococci</i>	16
<i>Lactobacilli</i>	28
<i>Bacilli</i>	338
<i>Miscellaneous bacteria</i>	274
<b>แอคติโนมัยซีท</b>	
<i>Mycobacterium</i>	4
<i>Actinoplanes</i>	18
<i>Streptomyces</i>	3,872
<i>Micromonospora</i>	41
<i>Thermoactinomyces</i>	17
<i>Nocardia</i>	48
แอคติโนมัยซีทสกุลอื่นๆ	2,078

ที่มา : Coyne, 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

สารประกอบ	สายพันธุ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Abyssomicins (1)	<i>Verrucosisspora</i> sp	Antibacterial	Riedlinger และคณะ, 2004
Cebulactams (2)	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	Antibacterial; antioxidant	Pimentel-Elardo และคณะ, 2008
Chandrananimycins (3)	<i>Actinomadura</i> sp.	Antiblagl; antibacterial; anticancer; antifungal	Maskey และคณะ, 2003
Proximicin (4)	<i>Verrucosisspora</i> sp.	Anticancer	Philip และคณะ, 2008
Ikarugamycin (5)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial, antiprotozoal, antiulcer	Brunter และคณะ, 2005
Chloro-dihydroquinones (6)	<i>Novelactinomycete</i> sp	Antibacterial; anticancer	Socia-Mercado และคณะ, 2005
Diazepinomycin (ECO-4601) (7)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory	Charan และคณะ, 2004
Helquinoline (8)	<i>Jantibacter litnosus</i>	Antibacterial	Asolkar และคณะ, 2004
Mechercharmycins (9)	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh และคณะ, 2005
Salino:poramideA (NPI-0052) (10)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling และคณะ, 2003

## 2.5 เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทนความร้อน

จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่รุนแรง ซึ่งมีความสำคัญทางด้านจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะในกลุ่มของแอคติโนมัยสีทที่ทนความร้อน (thermophilic actinomycetes) จะมีความสำคัญมากทางด้านนิเวศวิทยา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สุขวิทยา และทางด้านอื่นๆอีกมากมาย

แอคติโนมัยสีทที่ทนความร้อน (thermophilic actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถทนต่อความร้อนได้หลายระดับขึ้นอยู่กับสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น สปอร์ของ *Thermoactinomyces vulgaris* สามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง แอคติโนมัยสีทที่ทนความร้อนจะพบได้ตามดินที่มีอุณหภูมิสูงเช่นบ่อน้ำร้อน น้ำพุร้อน และพบได้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมัก โดยจะเห็นเป็นจุดสีขาวคล้ายๆ ผงปูน หลังจากอุณหภูมิสูงขึ้นจนสูงมากเชื้อแอคติโนมัยสีท มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรียสาร เช่น เซลลูโลส ลิกนิน ไคติน และ โปรตีน ที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมักขณะที่อุณหภูมิสูงซึ่งเป็นการเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ขณะย่อยสลาย โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มักพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสมอในกองปุ๋ยหมัก ได้แก่ พวก *Thermoactinomyces* sp. *Thermomonospora* sp. และ *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Micropolyspora faenae*) ซึ่งเป็นพวกที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปมากขึ้นในการผลิตเอ็นไซม์จากแอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อน และมีการประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในการทำ ให้โปรตีนแตกตัว การผลิตเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูงในด้าน สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่ขึ้นกับอุณหภูมิต่างๆ นอกจากนี้ยังเจริญเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก และง่ายต่อการควบคุม การผลิตเอ็นไซม์ จึงมีแนวโน้มที่จะอาศัยจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นความก้าวหน้าอย่างหนึ่งทางเทคโนโลยีด้านชีวภาพ (biotechnology) ซึ่งแอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อนสามารถผลิตเอ็นไซม์ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น แอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อนที่สามารถผลิตเอ็นไซม์อะไมเลส (amylase) ได้เช่น *Thermomonospora curvata* (Stutzenberger และ Camell, 1977) *Thermomonospora vulgaris* (Shimizu และคณะ, 1978) และ *Thermoactinomyces* sp. (Obi และ Obido, 1984) สามารถผลิตเอ็นไซม์อะไมเลสได้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส แอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อนที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ไซลานเนส (xylanase) ได้แก่ *Thermomonospora* sp. (McCarthy และคณะ, 1985) แอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อนที่สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส (cellulases) *Thermomonospora* sp. สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (McCarthy และคณะ, 1985)

นอกจากนี้แอกติโนมัยสิตที่ทนความร้อนยังมีผลกระทบต่อสุขภาพในระบบ hypersensitivity pneumonitis (HP) ทำให้เกิดโรคปอดขาวนา (farmer's lung) ที่เกิดจากการสูดหายใจเอาฝุ่นละอองจากฟางข้าวที่ขึ้นรา (mouldy hay) หรือ จากพืชผักบางชนิด ทำให้เกิดปฏิกิริยาในระบบทางเดินลมหายใจแบบปอดอักเสบและมีการเสื่อมของสมรรถภาพการทำงานของปอดในการแลกเปลี่ยนก๊าซ จากการศึกษาต่าง ๆ เชื่อว่า farmer's lung hay (FLH) เป็นแอนติเจนเชิงซ้อน ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อพวก thermophilic actinomycetes ประกอบด้วยเชื้อ *Micropolyspora faeni* และ *Thermoactinomyces vulgaris* โดยจะทำให้มีอาการเหนื่อยหอบ ไข้หนาวสั่น ไอ เสมหะมีน้อย อาการดังกล่าวนี้เกิดขึ้นภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากได้รับฝุ่นละออง ฟางข้าว ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการเขียวเกิดขึ้น ตรวจร่างกายพบว่ามีเสียง crackles ในปอดทั้งสองข้าง ภาพรังสีทรวงอกอาจไม่พบสิ่งผิดปกติ หรืออาจพบหย่อมเล็ก ๆ บาง ๆ (miliary mottling) ในปอดทั้งสองข้าง โดยเฉพาะในบริเวณส่วนกลางหรือส่วนล่างของปอด อาการและภาพรังสีทรวงอกจะดีขึ้นเองภายใน 3 - 4 สัปดาห์ต่อมา แต่ถ้าได้รับฝุ่นละอองของฟางข้าว ซ้ำอีกก็จะทำให้เกิดพยาธิสภาพแบบร่องเยียบปอดหรือแบบเรื้อรังได้ โดยผู้ป่วยจะมีอาการไอเรื้อรัง เหนื่อยง่ายเวลาออกแรง ภาพรังสีทรวงอกในระยะนี้จะมีลักษณะไม่ชัดเจน อาจพบ fibrosis กระจายทั่วไป หรือลักษณะแบบรังผึ้ง ผู้ป่วยอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Petrova และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

- |   |  |
|---|--|
| 3.1.1 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)   | รุ่น BE 600 บริษัท Memmert,<br>Germany                   |
| 3.1.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)   | HIRAYAMA รุ่น KICLAVE, Japan                             |
| 3.1.3 กล้องจุลทรรศน์  | บริษัท Olympus, Japan                                    |
| 3.1.4 ตู้ปลอดเชื้อ  | รุ่น UV-126 International scientific<br>supply, Thailand |
| 3.1.5 เครื่องชั่งสาร ทศนิยม 4 ตำแหน่ง                                       | รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius,<br>Germany                 |
| 3.1.6 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)   | EUTECH INSTRUMENT P4510,<br>USA                          |
| 3.1.7 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)  | รุ่น LUE 600 บริษัท Memmert,<br>Germany                  |
| 3.1.8 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)                                       | บริษัท Memmert, Germany                                  |
| 3.1.9 เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex)   | รุ่น MS 1, KIKA Worke, Malaysia                          |
| 3.1.10 เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer)                                     | รุ่น F-G009  |
| 3.1.11 ออโตปิเปต (automatic pipette)  |  |
| 3.1.12 หลอดทดลองขนาดเล็ก (ependorf tube)                                    |  |
| 3.1.13 แผ่นทิน-เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (TLC) ขนาด 10X10 เซ็นติเมตร no. 5716    |  |
| 3.1.14 แผ่นทิน-เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (TLC) ขนาด 20X20 เซ็นติเมตร no. 1.05715 |  |
| 3.1.15 เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (vacuum evaporator) รุ่น R-200              |  |
| 3.1.16 เครื่องเขย่า (shaker)  |  |

#### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- 3.2.2 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)
- 3.2.3 สารสกัดจากเนื้อ (meat extract)
- 3.2.4 วุ้น (agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.5 กลูโคส (glucose)
- 3.2.6 เปปโตน (peptone)
- 3.2.7 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate;  $K_2HPO_4$ )
- 3.2.8 แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- 3.2.9 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)
- 3.2.10 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate;  $(NH_4)_2H_2O$ )
- 3.2.11 แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate;  $CaCO_3$ )
- 3.2.12 กลีเซอรอล (glycerol)
- 3.2.13 แอล-ไทโรซีน (L- tyrosine (Difco))
- 3.2.14 แอล-แอสพาราจีน (L- Asparagine (Difco))
- 3.2.15 ไอรอนซัลเฟต (iron sulfate;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- 3.2.16 กรดฮิวมิก (humic acid)
- 3.2.17 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride; KCl)
- 3.2.18 เบซิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate)
- 3.2.19 นิสทาติน (nystatin)
- 3.2.20 กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid)
- 3.2.21 แป้งที่ละลายได้ในน้ำ (soluble starch)
- 3.2.22 เจลาติน (gelatin)
- 3.2.23 ทริส-กรดไฮโดรคลอริก (Tris-HCl)
- 3.2.24 Tris-SDS
- 3.2.25 เอนไซม์ย่อยเซลลูลัส (lysozyme)
- 3.2.26 ซาลีน-อีดีทีเอ (saline-EDTA)
- 3.2.27 ฟีนอล (phenol)
- 3.2.28 คลอโรฟอร์ม (chloroform)
- 3.2.29 เอ็นเอ็มเอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนฟไทลามีน (N,N-dimethyl-L-naphylamine)
- 3.2.30 กรดซัลฟานิลิก (sulphanilic acid)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ

##### 3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินที่ตำแหน่งต่างๆ ในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดราชบุรีและระนอง

ตัวอย่างละ 500 กรัม เก็บรักษาตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.1.2 การแยกเชื้อ

การใช้ความร้อนชื้น (moist heat treatment)

นำตัวอย่างดินที่ยังชื้นอยู่ 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้มีระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางทั้งสองมาเกลี่ยลงบนอาหาร SCN ที่เติมสารปฏิชีวนะ นิสทาตินและกรดนาลิดิซิกละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอลปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

เมื่อบ่มเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เลือกเก็บเชื้อที่มีลักษณะของเชื้อ แอคติโนมัยสิท โดยตรวจลักษณะโคโลเนียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ชนิดพิเศษ จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร ISP 2 และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหาร ISP 2 เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

### 3.3.1.3 การคัดเลือกเชื้อ

ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีลักษณะที่น่าสนใจ จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ทั้งหมด โดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลเนียที่แตกต่างทางด้าน รูปร่างลักษณะ สีของเส้นใยอาหารหรือเส้นใยอากาศ การสร้างสปอร์ มีการเจริญยาก หรือมีการเจริญช้ากว่าเชื้ออื่นๆ

## 3.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดแยกได้

### 3.3.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (morphological and cultural characteristics)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพิจารณาจากการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหาร 1 ต่อ 5 ISP 2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อสร้างสปอร์แล้วตรวจสอบลักษณะการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ชนิดพิเศษ และถ่ายรูปสปอร์

การตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อ ทำโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบที่กำหนดอยู่ใน ISP ชนิดต่างๆ จากนั้นตรวจผลโดยคุณลักษณะการเจริญของเชื้อ สีของเส้นใยอาหารหรือเส้นใยอากาศ และการสร้างสปอร์ที่เชื้อสร้าง โดยเทียบกับระดับสีมาตรฐาน ISC-NBS centroid color chart (Mundie และ David, 1950)

### 3.3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา (biochemical and physiological characteristics)

#### 1. การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอน

ในการทดสอบการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนใช้อาหาร basal medium agar (Shirling และ Gottlieb, 1966) ซึ่งเติม bromo cresol purple ที่ความเข้มข้น 0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย

No carbon source	D-ribose
D-xylose	inositol
D-mannitol	Glycerol
L-rhamnose	Salicin
Raffinose	D-galactose
Cellobiose	Lactose
L-arabinose	D-fructose

ทำการทดสอบโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ โดยเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ มาหยดลงบนอาหารที่ใช้ทดสอบแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดตรวจผลโดยเปรียบเทียบลักษณะการเจริญบนอาหารที่ทดสอบเทียบกับเชื้อควบคุม (positive และ negative control)

#### การอ่านผลการทดสอบ

(+) คือมีการใช้แหล่งคาร์บอน เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร basal medium agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนมากกว่าอาหาร basal medium agar ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน

(W) มีการใช้แหล่งคาร์บอนไม่แน่ชัด เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร basal medium agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนมากกว่าอาหาร basal medium agar ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนเล็กน้อยแต่น้อยกว่าการเจริญของเชื้อเจริญบนอาหาร basal medium agar ที่เติมกลูโคส

(-) ไม่มีการใช้แหล่งคาร์บอน เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร basal medium agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนใกล้เคียงกับอาหาร basal medium agar ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน

#### 2. การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร inorganic salt-starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยการเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลินี่ที่เชื้อขึ้น แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเห็นเป็นสีน้ำเงินรอบๆ โคลินี่

#### 3. การย่อยสลายและตกตะกอน โปรตีนนม (coagulation and pentinization)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในน้ำนม (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นพบว่าจากเดิมที่มีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นขาวใส ถ้ามีการตกตะกอนจะมีตะกอนนมตกลงที่ก้นหลอด

#### 4. การย่อยสลายเจลาติน (gelatinization)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร Bouillon Gelatin broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบโดยนำหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อไว้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าเชื่อมีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

#### 5. การย่อยสลายไนเตรท (nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในอาหาร peptone nitrate broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบโดยเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก 2 หยด และสารละลายเอ็นเอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนฟโธลามีน 3 หยด ถ้าเชื่อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงส้ม

#### 6. การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 2 3 4 5 6 และ 7 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ

#### 7. การเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2 ที่ปรับพีเอชเป็น 4 4.5 5 6 8 และ 9 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญที่ระดับพีเอชต่างๆ

#### 8. การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 30 37 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

3.3.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เชื้อเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract-malt extract broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง นำเซลล์ที่เก็บได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน ก่อนนำไปทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) นำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ห้องคัพประกอบทางเคมีต่อไป

### 1. การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)

ตรวจสอบลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์ของเชื้อโดยการสลายเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล (6N HCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาแยกตะกอนออก นำส่วนที่เป็นสารละลายไปทำให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสภาวะสุญญากาศที่ 60 องศาเซลเซียส ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปจุด (spot) บนแผ่น cellulose TLC ขนาด 10X10 เซนติเมตร (no. 5716) นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของเมทานอล-น้ำ-กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล-ไพริดีน (methanol-water-6N HCl-pyridine) ในอัตราส่วน 80:26:4:10 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่น เป่าให้แห้ง นำไปจุ่มลงในตัวทำละลายดังกล่าวอีกครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (0.5% ninhydrin solution) ในอะซีโตน (acetone) ให้ทั่วทั้งแผ่น นำไปอบความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 นาที ตรวจสอบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพิเมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ (ชาลววิทย สूरियन्ตรกุล, 2546)

### 2. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole cell sugar)

ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ โดยสลายเซลล์แห้ง 50 มิลลิกรัมด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นเติมสารละลายอิ่มตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $Ba(OH)_2$ ) ลงไปจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้มาเติมบิวทานอล 1 ถึง 2 หยด แล้วระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เมื่อแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปจุดบนแผ่น cellulose TLC (no. 5716) นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในระบบตัวทำละลายผสมของบิวทานอล:น้ำกลั่น:ไพริดีน:โทลูอีน (toluene) อัตราส่วน 10:6:6:1 ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น เป่าให้แห้ง ทำซ้ำอีกครั้ง นำแผ่น TLC ที่แห้งแล้วมาพ่นด้วยสารละลายแอนนิลีน พทาเลท (aniline phthalate) ที่ประกอบด้วยกรดพทาลิก (phthalic acid) 3.25 กรัม บิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร แอนนิลีน (aniline) 2 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 5 ถึง 10 นาที เพื่อดูจุดที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard) (ชาลววิทย สूरियन्ตรกุล, 2546)

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1. ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส แมนโนส ซาโลส และ แรมโนส

กลุ่มที่ 2. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และไรโบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณที่ปรากฏแถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี 2 แบบ คือ แถบสีที่มีสีชมพูได้แก่ น้ำตาลไรโบส ไซโลส และอะราบิโนส และแถบสีเหลืองได้แก่ แรมโนส แมนโนส กลูโคส และกาแลคโตส

### 3. การวิเคราะห์ polar lipid

เตรียมสารโพลาร์ลิพิด (polar lipid) ตามวิธีของ Minnikin และคณะ (1984) โดยการสกัดเซลล์แห้ง 150 มิลลิกรัม ด้วยเมทานอล - น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.3 อัตราส่วน 100:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง เติมนิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง นำสารส่วนล่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีนำไปสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (อัตราส่วน 90:100:30) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ ทำการสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (อัตราส่วน 50:100:40) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนใสไปรวมในหลอดทดลองข้างต้น นำส่วนใสที่ได้ไปสกัดต่อในชั้นคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนบนทิ้ง นำสารสกัดส่วนล่างไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำการวิเคราะห์ฟอสโฟลิพิดโดยละลายสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล อัตราส่วน 2:1 และดูดสารตัวอย่างจุดลงบน silica TLC (Kieselgel 60 F254, 10x10 cm) นำแผ่น PTLC ที่ได้มาทำการ develop 2 ทิศทาง (two dimensional development) ในระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (65:25:4) และคลอโรฟอร์ม-กรดอะซิติก (acetic acid)-เมทานอล-น้ำ (40:7.5:6:2) เมื่อแห้งแล้วนำไปรมด้วยไอโอดีนแล้วพ่นด้วยสารละลายผสมดังนี้ (Minnikin และคณะ, 1984)

(1) Dittmer และ Lester สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิพิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)

(2) Ninhydrin อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ phosphatidylethanolamine (PE), methyl - phosphatidylethanolamine (methyl-PE) และ OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE) (จุดสีชมพู)

(3) Anisaldehyde อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้สำหรับวิเคราะห์ ไกลโคลิพิด และลิพิดอื่นๆ (จุดสีเหลืองอมเขียว)

(4) Dragendorff ใช้สำหรับวิเคราะห์ phosphatidylcholine (PC) (จุดสีส้ม)

### 3.3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทมาจัดเป็นเส้นยวบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบมาขีดตั้งฉากให้ชิดโคโลนีของแอกติโนมัยสีท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (Rheims *et al.* 1999) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, MRSA และ *Candida albicans* ATCC 10231 การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตรวจสอบได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของแอกติโนมัยสีทและเชื้อทดสอบ

### 3.3.2.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ phylogenetic tree

#### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว ISP 2 ที่เติมกรดอะมิโนไกลซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ถึง 0.3 โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจะเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยสารละลายซาไลน์ –อีดีทีเอ พีเอช 8 ล้างซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย 10 M Tris-HCl 2-3 มิลลิลิตร และเติมไลโซไซม์ประมาณ 10-15 มิลลิกรัม พร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน ซึ่งการเติมไลโซไซม์จะมีผลในการย่อยผนังเซลล์ จากนั้นบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสังเกตเห็นสารละลายเหนียวหนืด เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมสารละลาย 10x SSC 60 ไมโครลิตร และเติม Tris-SDS 500-1000 ไมโครลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอลต่อคลอโรฟอร์ม (phenol : chloroform) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน 10 –20 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆดูดส่วนใสด้านบนใส่ในบีกเกอร์ขนาดเล็กขนาด 50 มิลลิลิตร เติมแอลกอฮอล์ที่แช่เย็น ร้อยละ 99 ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลายในบีกเกอร์ ซึ่งแอลกอฮอล์นี้จะช่วยตกตะกอนดีเอ็นเอเห็นเป็นสีขาว จากนั้นใช้แท่งแก้วเล็กหุมน (spooling) พันสายดีเอ็นเอให้ติดมากับแท่งแก้ว แล้วล้างดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และร้อยละ 95 ตามลำดับ ตั้งดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งแห้ง และนำแท่งแก้วที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 1x SSC ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

## 2. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สาย

### วิวัฒนาการ

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณในช่วง 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA thermal cycler (Gene Amp PCR System 9700 : Applied Biosystems) 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์นำมาทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABJ PRISM bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) (DNA technology กำแพงแสน) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะเปรียบเทียบ และทำ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ Blast program และ alignment software จำลองข้อมูลเป็น Multi-data set และสร้าง phylogenetic tree ใน MEGA software version 2.1 และวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่ได้

### 13.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

#### 13.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณน้ำพุร้อนจังหวัดราชบุรี และระนอง ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 10 อย่าง คาดว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้อย่างน้อย 100 ไอโซเลต การเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita *et al.* (1986)

#### 13.1.2 การแยกเชื้อ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 13.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol

### 13.1.4 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดียวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ขีดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

## 13.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

### 13.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shirling and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

**13.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)**

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

#### 13.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

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

#### 13.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

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

#### 13.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

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

#### 13.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน จากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography

#### 13.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2:1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck. No. 1.05715 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

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

##### 13.2.3.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

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

##### 13.2.3.2 การวิเคราะห์

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

#### 13.2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

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

### 13.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

#### 13.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

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

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

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

#### 13.2.5.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

#### 13.2.5.4 Hybridization

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยสารละลาย 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

### 3. การหมักเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO<sub>3</sub>; pH 7.3) โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของ ethyl acetate (crude EtOAc extract) สารสกัดหยาบที่ได้แต่ละส่วนนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

#### ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของ ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) สำหรับแบคทีเรียทดสอบ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 µl/disc (ความเข้มข้น 50 mg/ml) ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง

บริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีท

จากการเตรียมตัวอย่างดินโดยการต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (moist-heat treatment) สามารถทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้ 101 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่

4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะดินตัวอย่างและรหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

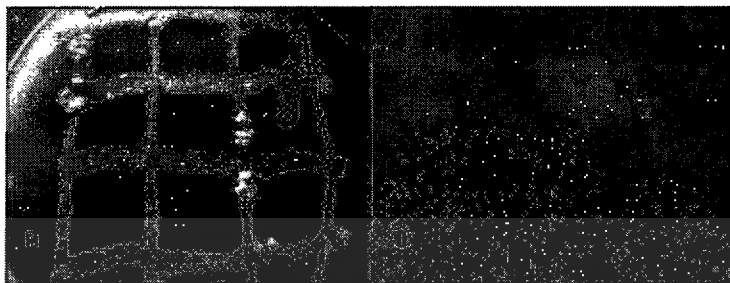
ตัวอย่างดิน	จังหวัด	ลักษณะดิน	สกุล	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อคั้วแทนกลุ่ม
HSS5	ราชบุรี	โคลนสีดำนีพิเศษใบไม้	<i>Micromonospora</i>	39	HSS5-1
HSS6	ราชบุรี	ดินสีน้ำตาลเปียก	<i>Micromonospora</i>	21	HSS6-8
BNR2	ระนอง	ดินโคลนปนทราย	<i>Planosporangium</i>	1	BNR2-13-1
BNR7	ระนอง	เศษใบไม้ กิ่ง ไม้เปียก	<i>Microbispora</i>	17	BNR7-1
BNR8	ระนอง	ดินสีน้ำตาลเปียก	<i>Streptomyces</i>	21	BNR8-1
			<i>Laceyella</i>	2	BNR8-11-5

#### 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

##### 4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จำนวน 101 ไอโซเลต มาทำการตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์โดยใช้ลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท สามารถจัดกลุ่มแอกติโนมัยสีทได้ 6 กลุ่ม ดังนี้

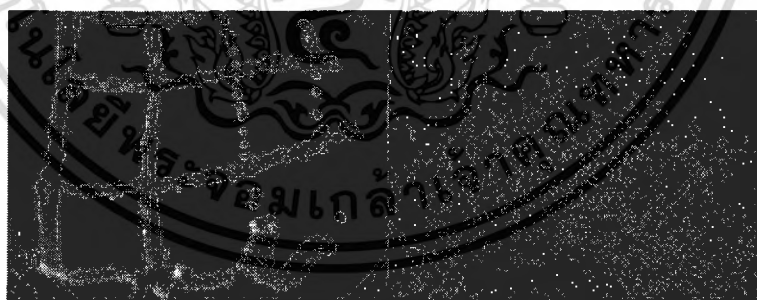
กลุ่มที่ 1 เชื้อไอโซเลต HSS5-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม สร้างสปอร์ สีน้ำตาลเข้มบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรท และโปรตีนนมได้ แต่สามารถย่อยสลายแป้งได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้นอินโนซิทอล ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.1 ก. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต HSS5-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน

ข. แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

กลุ่มที่ 2 เชื้อไอโซเลต HSS6-8 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาล สร้างสปอร์สีน้ำตาลบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุด ร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 7-9 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายลาติน และโปรตีนนมได้ แต่สามารถย่อยสลายไนเตรทและแป้งได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้บางชนิดคือ ไซโลส เซลโลไบโอส อะราบิโนส ไรโบส ฟรุกโตส ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.2 ก.แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต HSS6-8 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน

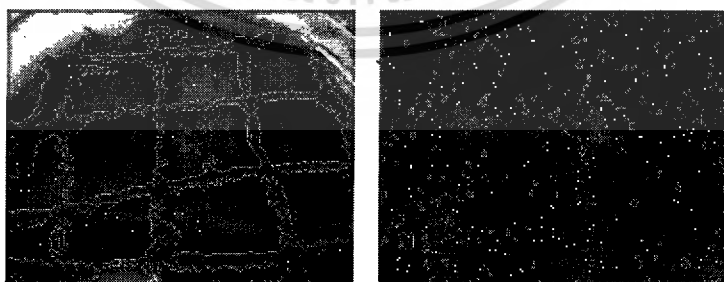
ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

กลุ่มที่ 3 เชื้อไอโซเลต BNR8-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน และเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-8 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 55 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรท แป้ง และ โปรตีนนมได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกชนิด ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.3 ก.แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อ ไอโซเลต BNR8-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน  
ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

กลุ่มที่ 4 เชื้อไอโซเลต BNR7-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเหลืองและเส้นใยอากาศสีน้ำตาลเข้ม สร้างสปอร์สีดำ บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และ โปรตีนนมได้ แต่สามารถย่อยสลายแป้ง และไนเตรทได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกชนิด ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.4 ก.แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อ ไอโซเลตที่ BNR7-1บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน  
ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

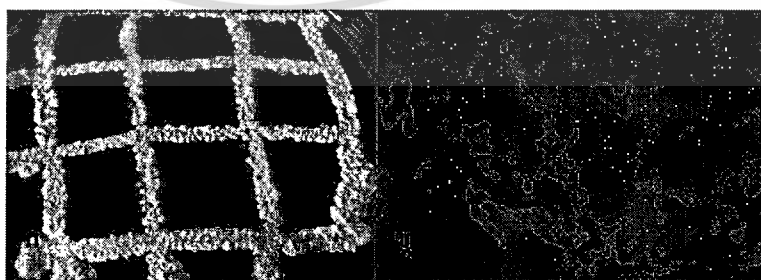
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์ที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มและเส้นใยอากาศสีส้ม สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-8 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรท และแป้งได้ แต่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้นแมนนิทอล แรมโนส ราฟฟิโนส และซาลิซิน ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.5 ก.แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ ไอโซเลต BNR2-13-1 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

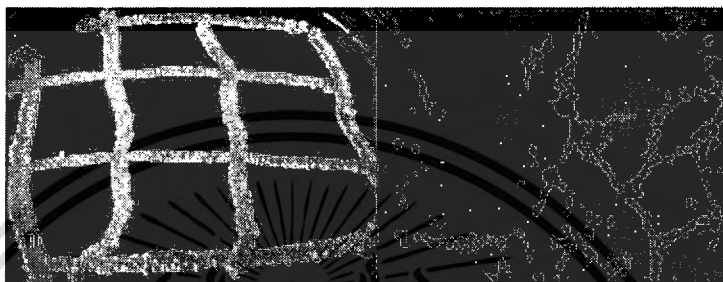
เชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์ที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองน้ำตาลและเส้นใยอากาศสีขาว สร้างสปอร์สีขาวบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 60 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรท แป้ง และโปรตีนนมได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกชนิด ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.6 ก.แสดงลักษณะ โคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-3 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสัที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองน้ำตาลอ่อน และเส้นใยอากาศสีขาว สร้างสปอร์สีขาวบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 60 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรทได้ แต่สามารถย่อยสลายเจลาติน แป้ง และโปรตีนนมได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกชนิด ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.7 ก.แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BNR8-11-3 บนอาหาร ISP 2 ระยะเวลา 14 วัน  
ข.แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)					ความเป็นกรด-ด่าง					อุณหภูมิ (°C)							Skim milk		การวางยาลดต้น	การรีดิวซ์ไนเตรท	การย่อยสลายแป้ง				
	1.5	2	3	4	5	4.5	5	6	8	9	20	30	37	45	50	55	60	65	Peptonization				Coagulation			
HSS5-1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
HSS6-8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
BNR8-1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BNR7-1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	W	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
BNR2-13-1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
BNR8-11-5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-	+	+	+	+	W	+	+
BNR8-11-3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	W	-	-	+	+	+	+	-	+	+

หมายเหตุ + = positive reaction  
 - = negative reaction  
 W = weakly reaction

ตารางที่ 4.3 การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลตต่างๆ

รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน														
	Glucose(+)	No carbon source (-)	D-xylose	D-mannitol	L-rhamnose	Raffinose	Cellobiose	L-arabinose	D-ribose	Glycerol	Salicin	D-galactose	Lactose	D-fructose	inositol
HSS5-1	+	+	w	+	+	+	w	w	+	w	+	w	+	w	-
HSS6-8	+	-	w	-	-	-	w	w	+	-	-	-	-	+	-
BNR8-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+
BNR7-1	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	w	+	+	w
BNR2-13-1	+	w	w	-	-	-	+	w	+	w	-	w	+	+	+
BNR8-11-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+
BNR8-11-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+

หมายเหตุ + = positive reaction  
 - = negative reaction  
 W = weakly reaction

#### 4.2.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท

##### 4.2.2.1 การวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมิลิกในผนังเซลล์

นำเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 7 ไอโซเลตมาทำการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมิลิกพบว่า มี 1 ไอโซเลตที่มีชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมิลิกเป็นแบบ *LL-DAP* ซึ่งนอกจากจะเป็นลักษณะของแอกติโนมัยสีทในวงศ์ *Streptomycetaceae* ส่วนอีก 7 ไอโซเลตมีชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมิลิกเป็นแบบ *meso-DAP* ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแอกติโนมัยสีทที่หายาก ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมิลิกในผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท

รหัสเชื้อ	ชนิดของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมิลิก (diaminopemilic acid type)	
	<i>meso-DAP</i>	<i>LL-DAP</i>
HSS5-1	+	-
HSS6-8	+	-
BNR8-1	-	+
BNR7-1	+	-
BNR2-13-1	+	-
BNR8-11-5	+	-
BNR8-11-3	+	-

+ = พบชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมิลิก  
- = ไม่พบชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมิลิก

##### 4.2.2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell sugar)

จากการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ ของเชื้อแอกติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลตพบว่า เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต BNR7-1 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม B คือ พบน้ำตาลมาคูลอส เป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ภายในเซลล์ เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม C คือ ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลเฉพาะ ส่วนเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต HSS5-1, HSS6-8, BNR8-1, BNR2-13-1 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม D คือ พบน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ภายในเซลล์ ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์

รหัสเชื้อ	ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์							
	Rhamnose	Ribose	Mannose	Arabinose	Galactose	Xylose	Glucose	Madurose
HSS5-1	-	+	+	+	-	+	+	-
HSS6-8	+	+	+	-	+	+	+	-
BNR8-1	-	+	+	-	+	-	+	-
BNR7-1	-	+	+	-	-	+	+	+
BNR2-13-1	-	+	+	+	-	+	+	-
BNR8-11-5	-	++	-	-	-	+	-	-
BNR8-11-3	-	++	-	-	-	+	-	-

- + พบน้ำตาลชนิดนั้นๆ ในเซลล์  
- ไม่พบน้ำตาลชนิดนั้นๆ ในเซลล์

#### 4.2.2.3 การวิเคราะห์โพลาร์ลิปิด (polar lipid)

การวิเคราะห์โพลาร์ลิปิด ของแอกติโนมัยซีททั้ง 7 ไอโซเลต พบรูปแบบของโพลาร์ลิปิด 2 รูปแบบได้แก่ กลุ่มที่มีรูปแบบของโพลาร์ลิปิดชนิดที่ 2 (phospholipid type II) คือมี phosphatidylethanolamine (PE) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ คือ ไอโซเลต HSS5-1, BNR2-13-1, BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 และ ที่มีรูปแบบของโพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4 (phospholipid type IV) คือมี phosphatidylethanolamine (PE) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วย กลูโคซามีน (Glucu) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ คือ ไอโซเลต HSS6-8, BNR8-1, BNR7-1 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงองค์ประกอบของโพลาร์ลิปิด จากเชื้อแต่ละไอโซเลต

รหัสเชื้อ	ชนิดของโพลาร์ลิปิด (polar lipid type)							
	DPG	PI	PE	DGDG	GluNu	APG	PG	PC
HSS5-1	+	+	+	-	-	+	+	-
HSS6-8	+	+	+	-	+	+	+	-
BNR8-1	+	-	+	-	+	-	-	-
BNR7-1	+	-	+	-	+	+	-	-
BNR2-13-1	+	-	+	-	-	+	+	-
BNR8-11-5	-	-	+	+	-	+	-	-
BNR8-11-3	-	-	+	+	-	-	+	-

PC = Phosphatidylcholine PE = Phosphatidylethanolamine PI = Phosphatidylinositol

PG = Phosphatidylglycerol DPG = Diphosphatidylglycerol

DGDG = Digalactosyldiacylglycerol APG = Acylphosphatidylglycerol

GluNu = An unknown structure containing glucosamine

เชื้อไอโซเลต HSS5-1 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส และกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), acylphosphatidylglycerol (APG) และ phosphatidylglycerol (PG) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

เชื้อไอโซเลต HSS6-8 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลแรมโนส ไรโบส แมนโนส กาแลคโตส ไซโลสและกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), acylphosphatidylglycerol (APG), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4)

(ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

เชื้อไอโซเลต BNR8-1 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมติกแบบ *LL* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วย กลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

เชื้อไอโซเลต BNR7-1 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ไซโลส กลูโคส และมาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), acylphosphatidylglycerol (APG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

เชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส อะราบีโนส ไซโลส และกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), acylphosphatidylglycerol (APG) และ phosphatidylglycerol (PG) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planomonosporangium*

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส และไซโลส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ phosphatidylethanolamine (PE), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) และ acylphosphatidylglycerol (APG) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Laceyella*

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-3 ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* (ตารางที่ 4.4) พบน้ำตาลไรโบส และไซโลส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (ตารางที่ 4.5) พบ phosphatidylethanolamine (PE),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) และ phosphatidylglycerol (PG) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.6) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Laceyella*

#### 4.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมใหญ่ของเชื้อแอกติโนมัยซีท

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ผลดังนี้

เชื้อไอโซเลต HSS5-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora eburnea* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.35 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 24 (รูปที่ 4.8)

เชื้อไอโซเลต HSS6-8 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora eburnea* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.28 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 47 (รูปที่ 4.8)

เชื้อไอโซเลต BNR8-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rangoonensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 97.61 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 67 (รูปที่ 4.9)

เชื้อไอโซเลต BNR7-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.7 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 44 (รูปที่ 4.10)

เชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Planosporangium flavigriseum* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.54 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 (รูปที่ 4.11)

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Laceyella putidus* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.04 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.12)

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-3 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Laceyella putidus* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์

(% similarity) ร้อยละ 99.04 (ภาคผนวก จ) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrat values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.12)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



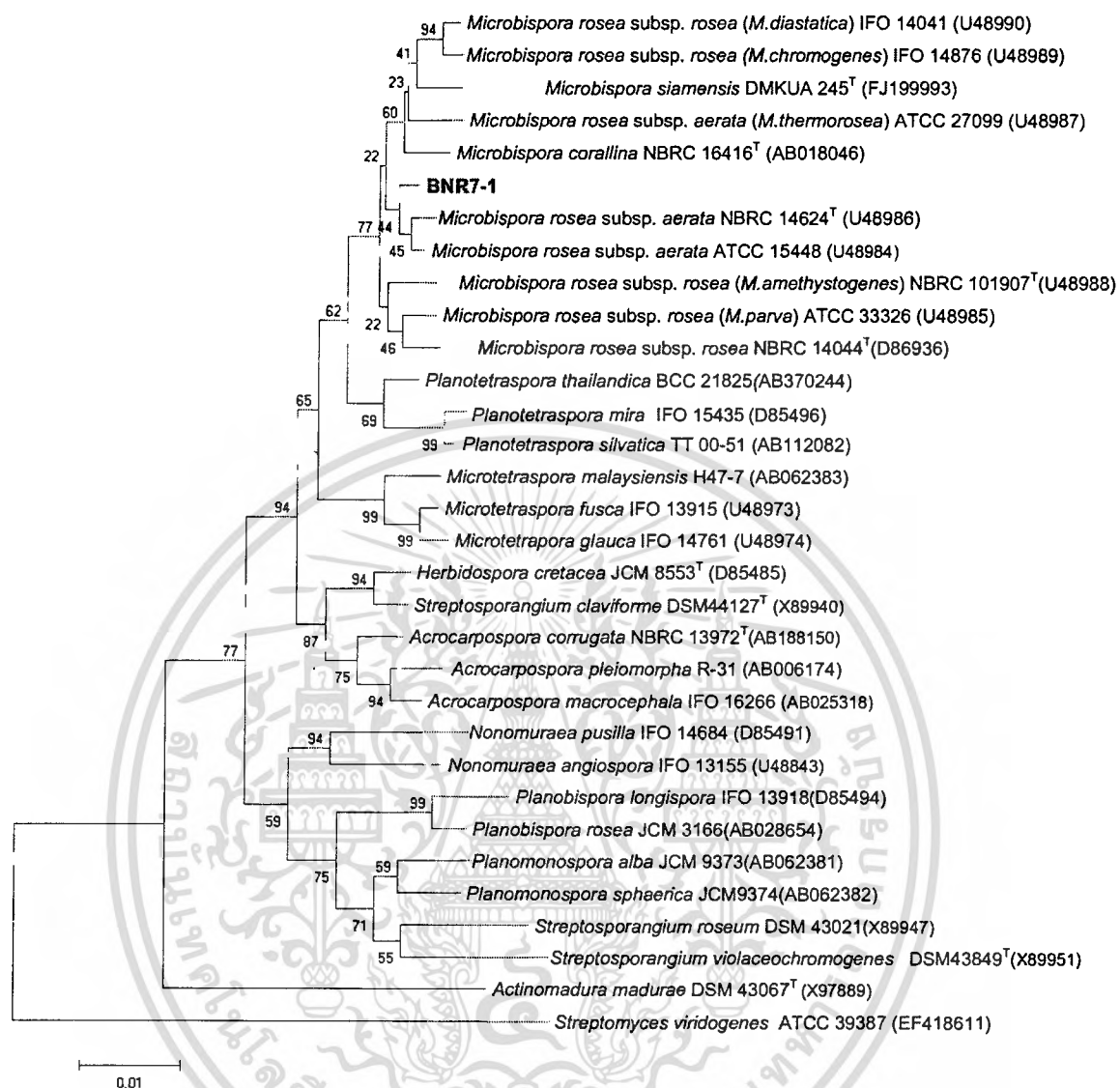
รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อ HSS5-1 และ HSS6-8 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



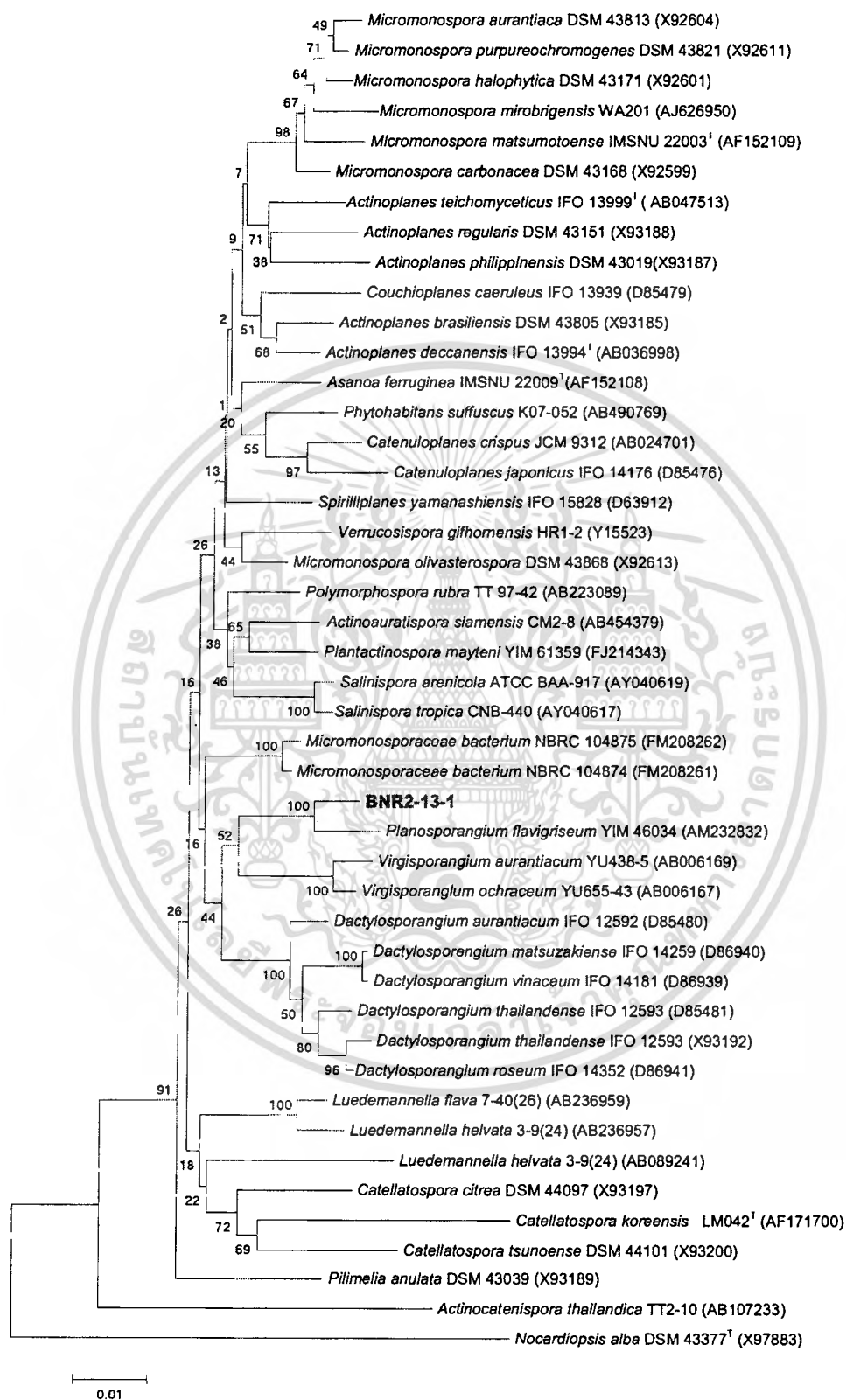
รูปที่ 4.9 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR8-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



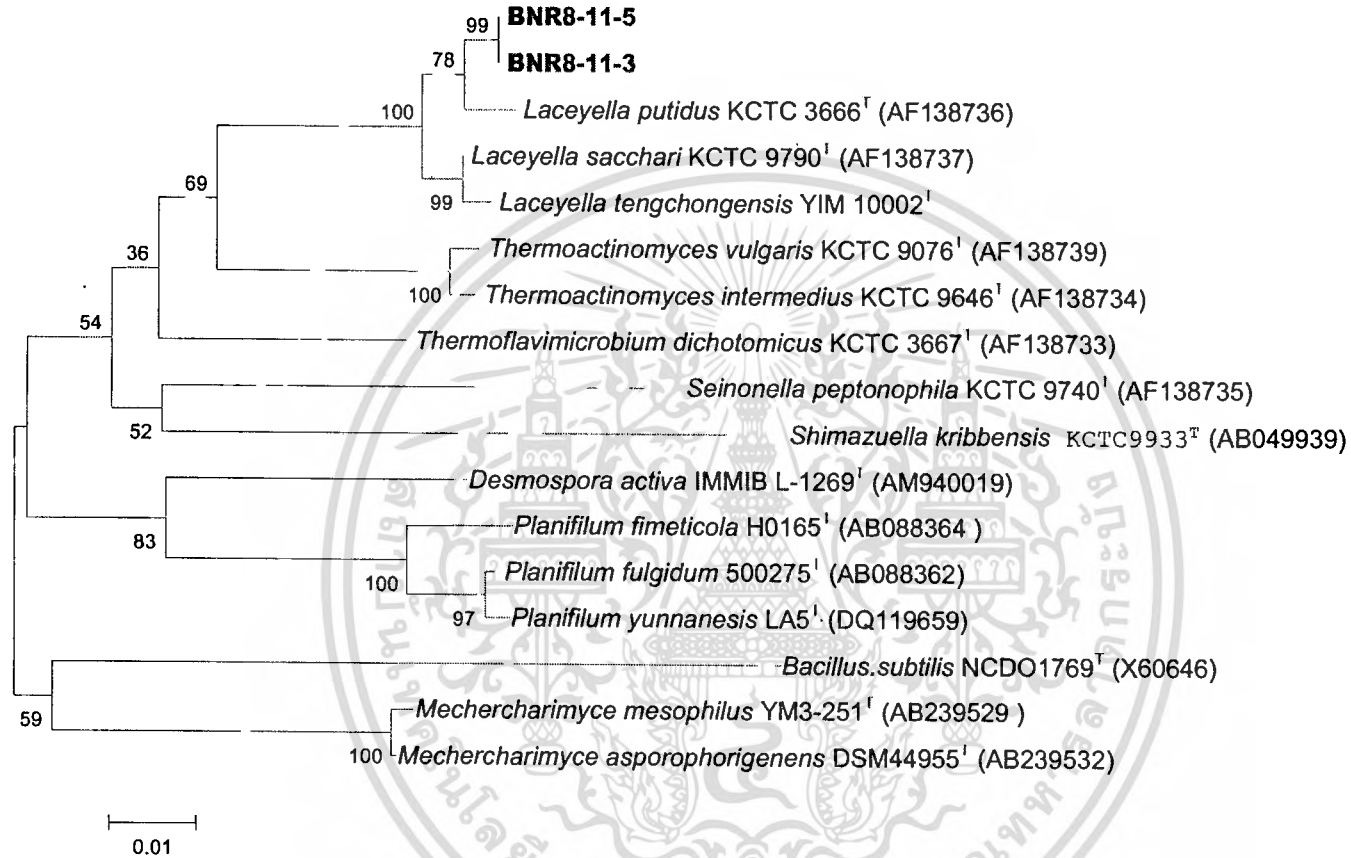
รูปที่ 4.10 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR7-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR2-13-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

#### 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลตพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BNR8-1, BNR7-1 และ BNR2-13-1 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตต่างๆ

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>MRSA</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albican</i>
HSS5-1	-	-	-	-	-	-
HSS6-8	-	-	-	-	-	-
BNR8-1	12	11	-	15	-	-
BNR7-1	-	9	-	12	8	9
BNR2-13-1	-	-	-	-	12	-
BNR8-11-5	7	-	7	-	-	-
BNR8-11-3	8	-	7	-	-	-

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดกระบี่ ประเทศไทย พบว่าตัวอย่างดินที่เป็นซากอินทรีย์สารพบเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากมากที่สุด สอดคล้องกับ Miyadoh (1997) ที่รายงานว่าตัวอย่างดินที่มีปริมาณฮิวมัสในดินมากมักพบประชากรของเชื้อแอกติโนมัยสีทได้มากเช่นกัน เมื่อนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร humic acid vitamins agar และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 – 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีของ M.Tseng (2007) ที่แยกเชื้อแอกติโนมัยสีททนความร้อนจากตัวอย่างดิน บริเวณน้ำพุร้อนและตัวอย่างดินบริเวณอื่นๆ โดยใช้อาหารสูตร humic acid vitamins agar ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน พบว่ามีประชากรของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ทนความร้อนเช่นในสกุล *Microbispora*, *Streptomyces* และ *Thermoactinomyces* ซึ่งปัจจุบันบางสายพันธุ์ที่อยู่ในสกุล *Thermoactinomyces* ได้ถูกแยกออกมาเป็นสกุล *Laceyella* (J.-H.Yoon และคณะ, 2005)



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินในบริเวณบ่อน้ำพุร้อนจังหวัดราชบุรีและระนอง สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่น่าสนใจได้ทั้งหมด 101 ไอโซเลต พบว่าเป็นแอกติโนมัยสีทที่แสดงชนิดของไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์แบบ LL-DAP 1 กลุ่มและพบเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แสดงชนิดไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์แบบ meso-DAP 5 กลุ่ม ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญสรีระวิทยา ชีวเคมี ศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ พบว่า

เชื้อไอโซเลต HSS5-1 และ HSS6-8 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร โดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Micromonospora* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora eburnea* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.35 และ ร้อยละ 98.28

เชื้อไอโซเลต BNR8-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เป็นสายยาว มีลักษณะเกลียวอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rangoonensis* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 97.61

เชื้อไอโซเลต BNR7-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Microbispora* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.7

เชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์อยู่ในถุงสปอร์แรงเจีย มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์เป็นเชื้อสกุล *Planosporangium* และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Planosporangium flavigriseum* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.54

เชื้อไอโซเลต BNR8-11-5 และ BNR8-11-3 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตมีความเหมือนกันของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA เป็นในเชื้อสกุล *Laceyella* และมีความคล้ายคลึงกับ *Laceyella putidus* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99/04

จากงานวิจัยนี้สามารถรวบรวมสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่มีพิษที่พบจากดินในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดราชบุรีและระนองของประเทศไทย ได้หลายสกุลซึ่งมีประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในงานวิจัยด้านอื่นต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- เกรียงไกร จำเริญมา, วรัญญา ตันติยุทธ และ เตือนจิต สัตยาวิรุทธ์. 2539. “ประสิทธิภาพของ EM เพื่อป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบ”. วารสารเกษตรศาสตร์. 30, 92-96.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. “แอคติโนมัยไซต์ที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราช และสถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกสิกิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ควบคุม คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- ไพรัตน์ ชงทอง. 2551. เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย gel Electrophoresis. [Online]. Available : [www.satriwit.ac.th/.../index.php?](http://www.satriwit.ac.th/.../index.php?)
- อานัฐ ตันโช. 2551. บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในการเกษตร. [Online]. Available : [http://www.be2hand.com/scripts/shop.php?do=article\\_detail&news\\_id=2465&user=kase dinsee](http://www.be2hand.com/scripts/shop.php?do=article_detail&news_id=2465&user=kase dinsee)
- Boondaeng, A., Ishida, Y., Tamura, T., Tokuyama, S., and Kitpreechavanich V. 2009. *Microbispora siamensis* sp. nov., Thermotolerant actinomycete, Isolated from Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Papers in Press
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics. 58, 1-26.
- Boudiella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiology research. 161, 288-298.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Order Actinomycetales, pp. 675-881. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A. W. Ravin and R.Y. Stanier. (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.
- Crook, P., Carpenter, C.C. and Klens, P.F. 1950. The use of sodium propionate in isolating Actinomycetes from soils. Science 10, 655-656.
- Cross, T. and Goodfellow, M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes, pp. 254-261. In G. Sykes and F.A. Skinner. Actinomycetes : Characteristics and Practical Importance. Academic Press, London.

- Coyne, M.S. 1999. Soil microbiology : an exploratory approach delmar. An International Thomson Publishing company, USA. 102-106.
- Czoch, W.P. 1988. Actinomycetes enzyme. pp. 219-283. In Goodfellow, M. , S.T. Williams and M. Mordarski. (eds.). Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London.
- Davis, G.H.G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their Chemical composition. Journal of General Microbiology. 21, 612-621.
- Garcia, L.C., Molina, E.M. and Trujillo, M.E. 2010. *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60, 331-337.
- Goodfellow, M. , Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London. 501 p.
- Isaac, S. and Jennings, D. 1995. Microbial Culture. Bios Scientific Publishers Limited. UK. 133 pp.
- Iwai, Y., Awaya, J., Kesado, T., Yamada, H., Omura, S. and Hata, I. 1973. Selective production Of cerulenin by *Cephalosporium caerelens* KF-140. Journal of Fermentation Technology. 51, 578-581.
- Jung, H.Y., In, G.K., Yong, K.S. and Yong, H.P. 2005. Proposal of the genus *Thermoactinomyces sensu stricto* and three new genera, Laceyella, Thermoflavimicrobium and Seinonella, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55, 395-400.
- Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*, pp. 2442-2450. In S.T. Williams, M.S. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.
- Kelner, A. 1948. A method for investigating large microbial population for antibiotic activity. Journal of Bacteriology. 56, 157-162.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. Methods in microbiology. 19, 161-207.

- Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 30, 928-929.
- Lechevalier, H.A. and Corke, C.T. 1953. The replica plate method for screening antibiotic Producing organisms. *Applied Microbiological*. 1, 110-112.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. and Gerber, N.N. 1971. Chemical composition as criterion in the classification of actinomycetes. *Advance In Applied Microbiological*. 14, 47-72.
- Lechevalier, M. P., Stern, A. E. and Lechevalier, H. A. 1981. Phospholipids in the taxonomy of Actinomycetes. *Journal of Zentbl Bakteriolog Hyg Abt 1 Suppl*. 11, 111-116.
- Liu, J., Barry, E.C., Besra, S.G., and Nikaido, H. 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 29545-29551.
- McCarthy, A.J., Peace, E. and Broda, P. 1985. Studied on extracellular xylanase activities of some thermophilic actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21, 238-244.
- Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiol Methods*. 2, 233-241.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.
- Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method Effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbiospora* and *Streptosporangium* strains in soil. 47, 463-469.
- Obi, S.K.C. and Obido, 1984. Some properties of a highly thermostable  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces* sp. *Canadian Journal of Microbiolgy* 30, 780-785.
- Okami, Y. and Hotta, A. K. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 33-67.
- Oki, T., Matsuzawa, Y., Yoshimoto, A., Numata, K., Kitamura, I., Hori, S., Takamatsu, A., Umezawa, H., Ishizuka, M., Naganawa, H., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. 1975. New antitumor antibiotics, aclacinomycins A and B. *Journal of Antibiot* 28, 830-834.

- Ottow, J.C. 1972. Rose Bengal as selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from Natural sources. *Mycologia*. 604, 304-315.
- Parenti, F. and Coroneli, C. 1979. Member of the genus *Actinoplanes* and their antibiotic. *Annual Review of Microbiology*, 33, 389-411.
- Petrova, D., Vlahov, S., Dalev, P. 2001. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E-producer of thermomostable collagenase. *Journal of Culture Collections*. 15, 57-64
- Rehacek, Z. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology*. 14, 73-92.
- Rheims, H., Felske, A., Seufert, S. and Stackebrandt, E. 1999. Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods*. 36, 65-75.
- Shimizu, M., Kanno, M., Tamura, M. and Suekane, M. 1978. Purification and some properties of a novel  $\alpha$ -mylase produced by a strain of *Thermoactinomyces vulgaris*. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1681-1688
- Shirling E.B., and Gottlieb, D. 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of System Bacteriol*. 16, 313-340.
- Stansly, P.G. 1947. A bacterial spray apparatus useful in searching for antibiotic producing. *Microbiology The Journal of Bacteriology*. 54, 443-445.
- Stutzenberger, F.J. and Carnell, R. 1977. Amylase production by *Thermomonospora curvatar*. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 234-236.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 417-422
- Waksman, S.A. 1959. *The Actinomycetes Vol. I : Nature, Occurrence and Activities*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 327 p.
- Waksman, S.A. and Henrici. 1974. Streptomycetaceae, pp. 747-753. *In* R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. *Bergey's manual of Determinative bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. , The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

- Weinstein, M.J., G.M., Luedemenn, Oden, E.M. and Wagman, G.H. 1946. Gentamicin, a new Broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1963, 1-7.
- Wiese, J., Jiang, Y., Shu, K.T., Thiel, V., Schmaljohann, R. Li, H.X., Cheng, L.J. and Imhoff, J.F. 2008. A new member of the family *Micromonosporaceae*, *Planosporangium flavigriseum* gen. nov., sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 58, 1324–1331.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces*, pp. 2452-2492. In S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). *Bergey's manual of determinative bacteria.* Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.
- Xin, O.Z., Wen, J.L., Wen, C.J., Li, Y., Wen, J.Y., Yu, Q.Z., Hans, P.K., Joo, W.S. and Feng, W.B. 2009. *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 59, 2870–2874
- Yamaguchi, T. 1965. Comprison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology.* 89, 445-453.

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### Humic acid-salts vitamin agar , modified, with basic antibiotics

Humic acid (ละลายใน 0.2N NaOH 10 มิลลิลิตร)	1 กรัม
Yeast extract	0.05 กรัม
Casamino acid Na	0.02 กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 กรัม
KCl	1.7 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.01 กรัม
Trace elements mix 1	0.2 มิลลิลิตร
Agar	18 กรัม
Water	1 ลิตร
pH 7.0	
Vitamins mix. A1	1 มิลลิลิตร
Nalidixic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	0.025 กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% เอทานอล)	0.05 กรัม
Terbinafin (ละลายใน เมทานอล)	0.01 กรัม

#### Yeast extract – malt extract agar , YMA , ISP2

Yeast extract	0.4 กรัม
Malt extract	1 กรัม
Glucose	0.4 กรัม
Agar	1.5-1.8 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.3	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Oatmeal agar , OM , ISP3**

Oatmeal	2.0 กรัม
Agar	1.8 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

**Inorganic salt – starch agar , IS , ISP4**

Soluble starch	1.0 กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 กรัม
NaCl	0.1 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.2 กรัม
$CaCO_3$	0.2 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.0-7.4	

**Glycerol – asparagine agar , Gly.A , ISP5**

Glycerol	1.0 กรัม
L- asparagine	0.1 กรัม
$K_2HPO_4$	0.1 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

**Tyrosine agar , TA , ISP7**

Glycerol	1.5 กรัม
L-Tyrosine	0.05 กรัม
L- Asparagine	0.1 กรัม
$K_2HPO_4$	0.05 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 กรัม
NaCl	0.05 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.2-7.4	

#### Carbon utilization medium , ISP9

Carbohydrate	1.0 กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.264 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.565 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·anhydrous	0.238 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 กรัม
Pridham and Gottlieb trace salt (B)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0	
Casamino acid 0.05%	

#### Nutrient agar , NA

Beef extract	1.0 กรัม
Peptone	1.0 กรัม
NaCl	0.15 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

#### Glucose asparagines agar

Glucose	1.0 กรัม
Asparagine	0.05 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Czapek's sucrose agar**

Sucrose	3.0 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.05 กรัม
KCl	0.05 กรัม
FeSO	0.001 กรัม
Agar	1.7 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2	

**Peptone KNO<sub>3</sub> broth**

Peptone	1.0 กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.1 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.0	

**Boullion gelatin broth**

Peptone	1.0 กรัม
Meat extract	0.5 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
Gelatin	15.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.0-7.2	

**Peptenization and Coagulation test medium**

Skim milk	10.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

**Basal inorganic nitrogen medium**

Carbohydrate	10 กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KCl	0.02 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 กรัม
0.04% Bromocresol purple	1.5 มิลลิลิตร
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH 7.0	

**Trace salt solution (A)**

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

**Pridham and Gottlieb trace salt (B)**

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.64 กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.11 กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.79 กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent)

#### 1. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อ

##### 1.1 สารละลายเบสกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01

Na-Lauryl-sulfate	0.1 มิลลิกรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.75 มิลลิกรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3.5 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร
pH = 6.8-7.0	

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.8 ถึง 7.0 นำเชื้อที่อุณหภูมิตั้งที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

##### 1.2 สารละลายฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5

ฟีนอล	15 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	985 มิลลิลิตร

ดวงฟีนอลใส่ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.8 ถึง 7.0 นำเชื้อที่อุณหภูมิตั้งที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

#### 2. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)

##### 2.1 สารละลายนินไฮดริน (ninhydrin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

นินไฮดริน	0.5 กรัม
อะซีโตน (acetone)	100 มิลลิลิตร

#### 3. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole-cell sugar)

##### 3.1 สารละลายอิมตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )

ค่อยๆ ใส่แบเรียมไฮดรอกไซด์ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งแบเรียมไฮดรอกไซด์ไม่ละลายน้ำ

### 3.2 สารละลายแอนนิลีน พทาเลท (aniline phtalate)

กรดพทาลิก (phtalic acid)	3.25 กรัม
บิวทานอลที่อิมตัวด้วยน้ำ	100 มิลลิลิตร
แอนนิลีน (aniline)	2 มิลลิลิตร

## 4. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด

### 4.1 dittmer และ lester

สารละลาย A ชั่ง molybdic anhydride ( $\text{MoO}_3$ ) 4.011 กรัม ละลายในกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 25 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยความร้อน

สารละลาย B ชั่ง molybdenum powder 0.178 กรัม ละลายใน สารละลาย A และต้มเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น บรรจุในขวดทึบแสง

ผสมสารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ฉีดพ่น

### 4.2 ninhydrin

สารละลาย ninhydrin ร้อยละ 0.4 ในบิวทานอลที่อิมตัวด้วยน้ำ

### 4.3 anisaldehyde

เอทานอล	90 มิลลิลิตร
กรดซัลฟูริก	5 มิลลิลิตร
<i>p</i> -anisaldehyde	5 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	1 มิลลิลิตร

### 4.4 dragendorff

สารละลาย A ชั่ง basic bismuth nitrate ปริมาณ 1.7 กรัม ละลายในกรดอะซิติก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

สารละลาย B ชั่ง โปแตสเซียมไอโอไดด์ ( $\text{KI}$ ) ปริมาณ 40 กรัม ละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 10 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติก ปริมาตร 80 มิลลิลิตรก่อนนำไปใช้ฉีดพ่น

## 6. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

### 6.1 TE buffer

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

### 6.2 EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 ลิตร)

EDTA	372.24 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 นอร์มอล NaOH เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

### 6.3 Tris-Cl (pH 8.0), ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 ลิตร)

Tris-base	121.1 กรัม
น้ำกลั่น	

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

### 6.4 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตปริมาณ 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

### 6.5 เอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

RNase A	20 มิลลิกรัม
NaCl (0.15 โมลาร์)	10 มิลลิลิตร

ชั่ง RNase A ปริมาณ 20 มิลลิกรัมใส่ใน NaCl ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที ทำการเก็บรักษา ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

### 6.6 Proteinase K ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Proteinase K	40 มิลลิกรัม
Tris-HCl (50 มิลลิโมลาร์)	10 มิลลิลิตร

ชั่ง Proteinase K ปริมาณ 40 มิลลิกรัมใส่ใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.5

## ภาคผนวก ก

### ลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละกลุ่ม

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน ( NBS-ISCC color system)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
HSS5-1	ISP2	ดี	vivid orange	vivid orange	-
	O.M.	ดี	deep orange	vivid orange	-
	I.S.	ดี	vivid orange	vivid orange	-
	T.A.	ปานกลาง	dark orange yellow	dark orange yellow	-
	Gly-A	ปานกลาง	vivid orange	vivid orange	-
	Glu-A	ปานกลาง	vivid orange	vivid orange	-
	Cz. sucrose	น้อย	colorless	colorless	-
	N.A.	ดี	vivid orange	vivid orange	-
	P.I.A.	-	-	-	-
	HSS6-8	ISP2	น้อย	strong yellow	dark olive brown
O.M.		-	-	-	-
I.S.		-	-	-	-
T.A.		น้อยมาก	yellowish white	yellowish white	-
Gly-A		-	-	-	-
Glu-A		น้อยมาก	yellowish white	yellowish white	-
Cz. sucrose		น้อยมาก	colorless	colorless	-
N.A.		น้อยมาก	strong yellow	strong yellow	-
P.I.A.		-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
BNR8-1	O.M.	ดี	light orange yellow	light orange yellow	-
	I.S.	ปานกลาง	pale greenish yellow	pale greenish yellow	-
	T.A.	ดี	grayish greenish yellow	grayish greenish yellow	-
	Gly-A	-	-	-	-
	Glu-A	ปานกลาง	light orange yellow	pale yellow	-
	Cz. sucrose	ดี	white	white	-
	N.A.	ปานกลาง	light orange yellow	light orange yellow	-
	P.I.A.	-	-	-	-
BNR7-1	ISP2	ดี	dark yellowish brown	deep yellowish brown	-
	O.M.	ดี	light brownish gray	light brownish gray	light grayish brown
	I.S.	ปานกลาง	light grayish olive	light grayish olive	-
	T.A.	น้อย	brownish black	grayish yellow	-
	Gly-A	น้อย	yellowish gray	yellowish gray	-
	Glu-A	น้อย	yellowish gray	yellowish gray	-
	Cz. sucrose	น้อย	yellowish brown	colorless	-
	N.A.	น้อย	yellowish gray	yellowish gray	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BNR2-13-1	ISP2	ดี	strong orange yellow	strong orange yellow	reddish brown
	O.M.	ดี	light brown	light brown	moderate brown
	I.S.	น้อย	-	light grayish red	-
	T.A.	ปานกลาง	dark yellowish brown	yellowish brown	grayish yellowish pink
	Gly-A	ปานกลาง	yellowish brown	moderate orange yellow	-
	Glu-A	ปานกลาง	yellowish brown	light yellowish brown	-
	Cz. sucrose	-	-	-	-
	N.A.	น้อย	strong reddish orange	strong reddish orange	-
	P.I.A.	-	-	-	-
BNR8-11-5	ISP2	ดี	white	strong yellowish brown	-
	O.M.	ปานกลาง	white	strong reddish orange	-
	I.S.	ดี	white	strong reddish orange	-
	T.A.	ดี	white	strong reddish orange	-
	Gly-A	ปานกลาง	white	strong reddish orange	-
	Glu-A	ปานกลาง	white	strong reddish orange	-
	Cz. sucrose	น้อย	white	colorless	-
	N.A.	ดี	white	light grayish reddish brown	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
BNR8-11-3	ISP2	ค	white	light yellowish brown	-
	O.M.	ค	white	pale yellow	-
	I.S.	ค	white	strong reddish orange	-
	T.A.	น้อย	colorless	colorless	-
	Gly-A	น้อย	white	colorless	-
	Glu-A	น้อย	colorless	colorless	-
	Cz. sucrose	น้อย	white	colorless	-
	N.A.	ค	white	strong reddish orange	-
	P.I.A.	น้อย	colorless	colorless	-

หมายเหตุ ISP2 = Yeast extract-malt extract agar, ISP3 = Oatmeal agar

ISP4 = Inorganic salts-starch agar, ISP5 = Glycerol asparagine agar

ISP6 = Peptone-yeast extract iron agar, ISP7 = Tyrosine agar


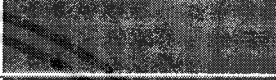
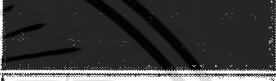



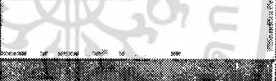








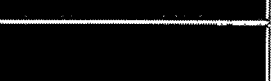

Glu.A. = Glucose asparagine agar, N.A. = Nutrient agar

Cz.sucrose = Czapek's sucrose agar








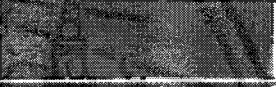



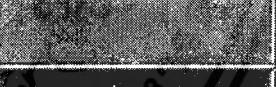



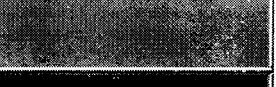
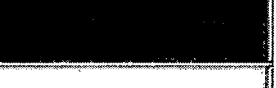


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## The NBS/IBCC Color System

### The 267 Color Centroids

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
<b>Red, Pink</b>			
<b>1 Vivid Pink</b>	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
<b>2 Strong Pink</b>	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
<b>3 Deep Pink</b>	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
<b>4 Light Pink</b>	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
<b>5 Moderate Pink</b>	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
<b>6 Dark Pink</b>	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
<b>7 Pale Pink</b>	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
<b>8 Grayish Pink</b>	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
<b>9 Pinkish White</b>	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
<b>10 Pinkish Gray</b>	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
<b>11 Vivid Red</b>	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
<b>12 Strong Red</b>	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
<b>13 Deep Red</b>	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
<b>14 Very Deep Red</b>	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
<b>15 Moderate Red</b>	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
<b>16 Dark Red</b>	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
<b>17 Very Dark Red</b>	2.0r 1.2 4.8	#320A18	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
<b>Yellowish Pink</b>			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
<b>Reddish Orange, Reddish Brown</b>			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	




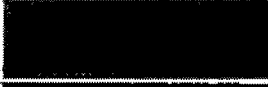


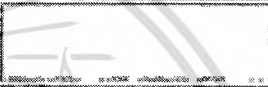



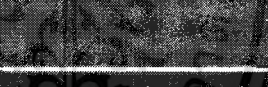


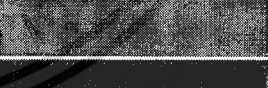
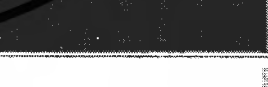
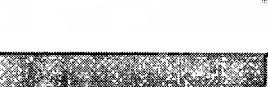
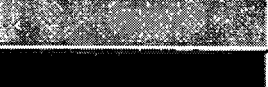



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	
41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	
<b>Orange Brown</b>			
48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	

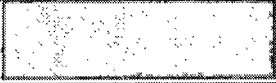

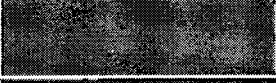
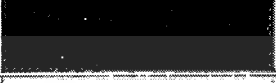

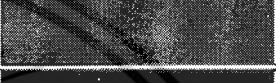
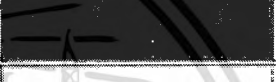
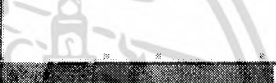






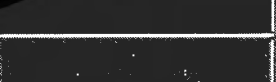




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
<b>Orange Yellow, Yellowish Brown</b>			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
<b>Yellow, Olive Brown</b>			
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	



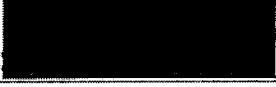


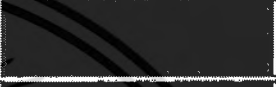







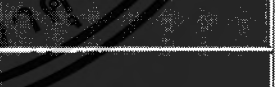
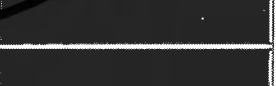


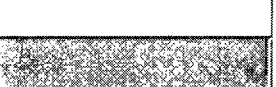


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Greenish Yellow, Olive			
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
Yellow Green, Olive Green			
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
<b>Yellowish Green</b>			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	


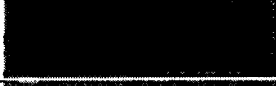


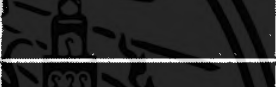







เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
<b>Green</b>			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
<b>Bluish Green</b>			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
<b>Greenish Blue</b>			
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	





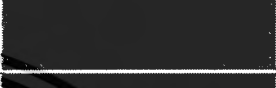


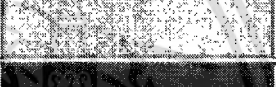










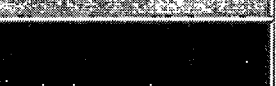

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	
<b>Blue</b>			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
<b>Purplish Blue</b>			







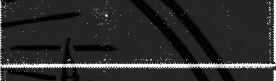



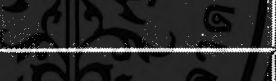

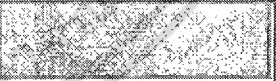
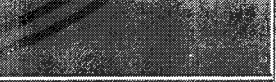
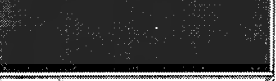
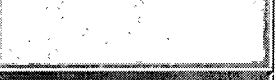



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
<b>Violet</b>			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	


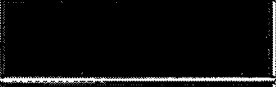



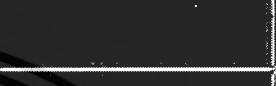


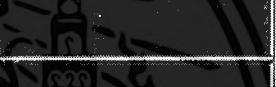






เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
<b>Purple</b>			
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
<b>Reddish Purple</b>			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
<b>Purplish Pink, Purplish Red</b>			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการศึกษา

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต HSS5-1

ACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCG  
AACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATAC  
CGAATAGGACCCGCGATCGCATGGTTGTGGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTAT  
CAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGA  
AGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGA  
AGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAG  
GGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCGTGCAGTGTGAAA  
ACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATT  
CTTGGTGTAGCGGTGAAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGCCGA  
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCTGTAAA  
CGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCC  
TGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGC  
GGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTC  
GGTCCCTTCGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGC  
CGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGC  
ATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCA  
GTTCCGATCGGGGCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCCGAGTGCCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGC  
CGGTGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGT

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต HSS6-8

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT  
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCGAGGCTTTGGGATAACCTTCGGAAACGGG  
GGCTAATACCGGATATTACCTTTCACTGCATGGTGGGGGGTGGAAAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTC  
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC  
GACCGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA  
ATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG  
CTCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGAGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AAGACGTAGGGCGGAGCGTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCTCGCTCG  
ACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG  
ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT  
CTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCA  
CGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAG  
CGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGC  
GGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCGACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCTGC  
AGAGATGTGGGGTCTTCGGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATC  
GAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGG  
GCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG  
CCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCCGAGTGCCTAGTAATCGCAGATC  
AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAAC  
ACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTTGTGGA

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต BNR8-1

GTCAGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCCCCTTCGGGGGTGGATC  
 AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGT  
 CTAATACCGGATATGACCACTTCGGGCATCCGTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCG  
 CGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG  
 ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGC  
 AGGGAAGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTA  
 ATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTTCGCGTCGG  
 ATGTGAAAGCCCAGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA  
 TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTC  
 TGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
 GCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGCATTCCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGT  
 GCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGC  
 GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCTGCA  
 GAGATGTGGCTCCCTTGTGGCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGGACTCACAG  
 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTGGG  
 CTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGC  
 CGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA  
 GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACA  
 CCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต BNR7-1

CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGC  
 GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTA  
 ATACCGGATACGACACATGGCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCG  
 GCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC  
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATG  
 GCGGAAGCCTGACGCGACGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAG  
 GGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTCGCGTCTGCCGTGA  
 AAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCGAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAA  
 TTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCC  
 AGTTCGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA  
 AACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGC  
 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATG  
 TTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGCATACACCGGAAACGCCAGAGATGG  
 GTGCCCTCTTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGT  
 TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCGTTTGGGTGGTGGGGACTCAT  
 GGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTG  
 GGCTGCAAAACATGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAA  
 GCCGCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT  
 CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAA  
 CACCGAAGCCCGTGGCCCAACCT

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต BNR2-13-1

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTC  
 GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAACCCGGGAAACCGGG  
 GCTAATACCGGATATGACTTCTGCCGCATCGGTGGGGTGGAAAGCTTTTTCGGTTCGGAGATGGGCTC  
 GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA  
 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCGA  
 CAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
 AAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCTCG  
 ACCGTGAAAACCTGGGGCTTAACCTAGGCTTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG  
 ACTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT  
 CTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
 CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAG  
 CGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGC  
 GGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGACGGAAATCCGGC  
 AGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGCCGTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCGATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCATC  
 GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGG  
 GCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCCAAAAG  
 CCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC  
 AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAAC  
 ACCGAAGCCGGTGGCCCAACCTTGTGGAGGGAG

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต BNR8-11-5

CNCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTGCGGGGGTCTTCGGACCCAGCGGCG  
 AACGGGTGAGTAACACGCTGGGCAACCTGCCCGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGTGCTAATAC  
 CAGATAACCTCCCCCTCCGCATGGAGAGGGAGTAAAAGGCTTCGGCCACTTACGGATGGGCCCCGCGCG  
 CATTAGCTTGTGGTGGTGGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGCAATGGGC  
 GCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTCTGTCTGAAAGGA  
 AGAAGTTCTGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
 GGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGGTGTGAAA  
 GGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAAT  
 CCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGC

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต BNR8-11-3

CGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGTGCGGGGGTCTTCGGACCCAGCGG  
 CGAACGGGTGAGTAACACGCTGGGCAACCTGCCCGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGTGCTAAT  
 ACCAGATAACCTCCCCCTCCGCATGGAGAGGGAGTAAAAGGCTTCGGCCACTTACGGATGGGCCCCGCGG  
 CGCATTAGCTTGTGGTGGTGGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC  
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGCAATGG  
 GCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTCTGTCTGAAAG  
 GAAGAAGTTCTGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGGTGTGA  
 AAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAA  
 TTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT

## ภาคผนวก จ

ระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่ตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต HSS5-1 และ HSS6-8 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Micromonospora*

TAXA	HSS5-1	HSS6-8	AB196710	AB193559	X92629	X92624	X92618	X92617	AB159779	AB107231	X92631	X92610	X92609	X92608	X92607	X92628	AJ560635
HSS5-1	100	97.95	99.28	99.2	99.13	99.2	98.98	98.98	98.84	99.35	98.84	99.06	98.47	98.91	99.2	98.84	98.69
HSS6-8	97.95	100	97.95	98.1	97.5	97.58	97.42	97.66	98.03	98.18	97.57	97.42	97.8	97.65	97.58	97.5	97.95
AB196710	99.28	97.95	100	98.91	98.62	98.69	98.69	99.28	99.42	99.13	98.61	98.54	98.77	98.33	98.69	98.91	98.76
AB193559	99.2	98.1	98.91	100	98.47	98.54	98.54	98.54	98.4	99.35	98.84	98.76	98.47	98.47	98.54	98.99	98.77
X92629	99.13	97.5	98.62	98.47	100	99.42	98.62	98.55	98.4	98.69	98.4	98.54	97.95	98.55	99.28	98.54	98.4
X92624	99.2	97.58	98.69	98.54	99.42	100	98.84	98.77	98.47	98.76	98.47	98.76	98.18	98.77	99.2	98.61	98.47
X92618	98.98	97.42	98.69	98.54	98.62	98.84	100	98.77	98.62	99.06	98.47	98.69	98.54	98.91	98.84	98.39	98.24
X92617	98.98	97.66	99.28	98.54	98.55	98.77	98.77	100	99.2	98.99	98.39	98.62	98.47	98.77	98.69	98.84	98.84
AB159779	98.84	98.03	99.42	98.4	98.4	98.47	98.62	99.2	100	98.76	98.17	98.17	98.32	98.33	98.47	98.54	98.69
AB107231	99.35	98.18	99.13	99.35	98.69	98.76	99.06	98.99	98.76	100	98.61	98.69	98.76	98.76	98.91	98.84	98.69
X92631	98.84	97.57	98.61	98.84	98.4	98.47	98.47	98.39	98.17	98.61	100	98.69	98.17	98.47	98.62	99.13	98.69
X92610	99.06	97.42	98.54	98.76	98.54	98.76	98.69	98.62	98.17	98.69	98.69	100	98.39	98.84	98.84	99.13	98.91
X92609	98.47	97.8	98.77	98.47	97.95	98.18	98.54	98.47	98.32	98.76	98.17	98.39	100	98.47	98.18	98.25	98.32
X92608	98.91	97.65	98.33	98.47	98.55	98.77	98.91	98.77	98.33	98.76	98.47	98.84	98.47	100	98.99	98.47	98.62
X92607	99.2	97.58	98.69	98.54	99.28	99.2	98.84	98.69	98.47	98.91	98.62	98.84	98.18	98.99	100	98.76	98.62
X92628	98.84	97.5	98.91	98.99	98.54	98.61	98.39	98.84	98.54	98.84	99.13	99.13	98.25	98.47	98.76	100	99.28
AJ560635	98.69	97.95	98.76	98.77	98.4	98.47	98.24	98.84	98.69	98.69	98.69	98.91	98.32	98.62	98.62	99.28	100

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต BNR8-1 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Streptomyces*

TAXA	BNR8-1	EF577247	AY876941	AY876942	AJ781366	AB184663	AB184258	DQ026669	AB184272	AY876940	AB473555	AB249964	AB249918	AB249969
BNR8-1	100	96.68	97.37	97.22	97.61	97.61	97.61	97.61	97.53	96.91	96.91	97.21	96.82	96.68
EF577247	96.68	100	97.68	96.91	97.29	97.29	97.29	97.29	97.37	97.38	98.44	97.06	96.91	96.67
AY876941	97.37	97.68	100	97.76	97.22	97.22	97.22	97.22	97.3	98.37	97.84	97.75	96.91	97.07
AY876942	97.22	96.91	97.76	100	96.68	96.68	96.68	96.68	96.6	97.83	96.53	97.76	97.6	96.99
AJ781366	97.61	97.29	97.22	96.68	100	100	100	100	99.93	96.69	96.99	96.2	96.83	97.22
AB184663	97.61	97.29	97.22	96.68	100	100	100	100	99.93	96.69	96.99	96.2	96.83	97.22
AB184258	97.61	97.29	97.22	96.68	100	100	100	100	99.93	96.69	96.99	96.2	96.83	97.22
DQ026669	97.61	97.29	97.22	96.68	100	100	100	100	99.93	96.69	96.99	96.2	96.83	97.22
AB184272	97.53	97.37	97.3	96.6	99.93	99.93	99.93	99.93	100	96.76	97.06	96.28	96.76	97.29
AY876940	96.91	97.38	98.37	97.83	96.69	96.69	96.69	96.69	96.76	100	97.23	96.91	96.21	96.84
AB473555	96.91	98.44	97.84	96.53	96.99	96.99	96.99	96.99	97.06	97.23	100	97.53	97.07	96.99
AB249964	97.21	97.06	97.75	97.76	96.2	96.2	96.2	96.2	96.28	96.91	97.53	100	96.91	96.76
AB249918	96.82	96.91	96.91	97.6	96.83	96.83	96.83	96.83	96.76	96.21	97.07	96.91	100	97.45
AB249969	96.68	96.67	97.07	96.99	97.22	97.22	97.22	97.22	97.29	96.84	96.99	96.76	97.45	100

ค่าร้อยละวัดความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต BNR7-1 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Microbispora*

TAXA	BNR7-1	FJ199993	U48990	U48988	U48985	AB018046	U48986	U48984	U48987	D85496	AB112082	AB370244	D86936	U48989
BNR7-1	100	97.96	98.57	98.88	98.95	98.88	99.25	99.7	98.58	98.04	98.19	98.73	98.73	98.49
FJ199993	97.96	100	98.19	97.34	97.65	97.96	97.5	97.65	97.81	96.49	96.72	97.12	97.27	98.27
U48990	98.57	98.19	100	98.34	98.42	98.57	98.27	98.57	98.73	97.19	97.42	97.89	98.04	99.48
U48988	98.88	97.34	98.34	100	99.1	98.42	98.88	99.18	97.96	97.5	97.73	98.12	98.42	98.42
U48985	98.95	97.65	98.42	99.1	100	98.8	99.25	99.25	98.19	97.81	98.04	98.27	99.03	98.34
AB018046	98.88	97.96	98.57	98.42	98.8	100	98.57	98.57	98.5	97.81	97.89	98.35	98.42	98.5
U48986	99.25	97.5	98.27	98.88	99.25	98.57	100	99.55	98.58	97.73	97.88	98.42	98.5	98.19
U48984	99.7	97.65	98.57	99.18	99.25	98.57	99.55	100	98.58	97.73	97.88	98.42	98.42	98.49
U48987	98.58	97.81	98.73	97.96	98.19	98.5	98.58	98.58	100	96.8	96.96	97.66	97.58	98.8
D85496	98.04	96.49	97.19	97.5	97.81	97.81	97.73	97.73	96.8	100	99.63	98.65	97.89	96.95
AB112082	98.19	96.72	97.42	97.73	98.04	97.89	97.88	97.88	96.96	99.63	100	98.72	98.12	97.34
AB370244	98.73	97.12	97.89	98.12	98.27	98.35	98.42	98.42	97.66	98.65	98.72	100	98.2	97.66
D86936	98.73	97.27	98.04	98.42	99.03	98.42	98.5	98.42	97.58	97.89	98.12	98.2	100	97.96
U48989	98.49	98.27	99.48	98.42	98.34	98.5	98.19	98.49	98.8	96.95	97.34	97.66	97.96	100

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไอโซเลต BNR2-13-1 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Planomonosporangium*

TAXA	BNR2-13-1	AM232832	X93185	AB036998	AB223089	X92613	X92604	X92601	X92611	AJ626950	X92599	D85480	AB006167	FM208262	FM208261
BNR2-13-1	100	98.54	96.28	96.06	96.68	95.89	96.59	96.75	96.82	96.13	96.29	96.22	95.91	96.75	96.82
AM232832	98.54	100	96.52	96.14	96.22	95.51	96.52	96.82	96.75	96.05	96.44	95.68	95.52	95.99	96.07
X93185	96.28	96.52	100	98.32	96.51	96.89	96.89	97.35	97.42	97.12	97.87	95.83	95.83	96.97	96.97
AB036998	96.06	96.14	98.32	100	97.5	97.95	96.82	97.2	97.35	96.82	97.28	95.83	95.91	97.35	97.27
AB223089	96.68	96.22	96.51	97.5	100	98.02	97.2	97.2	96.82	96.44	97.05	97.12	95.98	97.65	97.72
X92613	95.89	95.51	96.89	97.95	98.02	100	97.5	97.57	97.79	97.72	98.1	96.28	95.98	96.89	96.96
X92604	96.59	96.52	96.89	96.82	97.2	97.5	100	99.13	99.27	98.32	98.32	95.45	95.6	96.82	97.04
X92601	96.75	96.82	97.35	97.2	97.2	97.57	99.13	100	99.2	98.47	98.69	95.91	95.83	96.75	96.97
X92611	96.82	96.75	97.42	97.35	96.82	97.79	99.27	99.2	100	98.61	98.62	95.75	95.83	97.13	97.35
AJ626950	96.13	96.05	97.12	96.82	96.44	97.72	98.32	98.47	98.61	100	98.39	95.44	95.59	96.44	96.66
X92599	96.29	96.44	97.87	97.28	97.05	98.1	98.32	98.69	98.62	98.39	100	96.21	96.07	96.9	96.97
D85480	96.22	95.68	95.83	95.83	97.12	96.28	95.45	95.91	95.75	95.44	96.21	100	97.13	96.44	96.67
AB006167	95.91	95.52	95.83	95.91	95.98	95.98	95.6	95.83	95.83	95.59	96.07	97.13	100	96.22	96.22
FM208262	96.75	95.99	96.97	97.35	97.65	96.89	96.82	96.75	97.13	96.44	96.9	96.44	96.22	100	99.64
FM208261	96.82	96.07	96.97	97.27	97.72	96.96	97.04	96.97	97.35	96.66	96.97	96.67	96.22	99.64	100

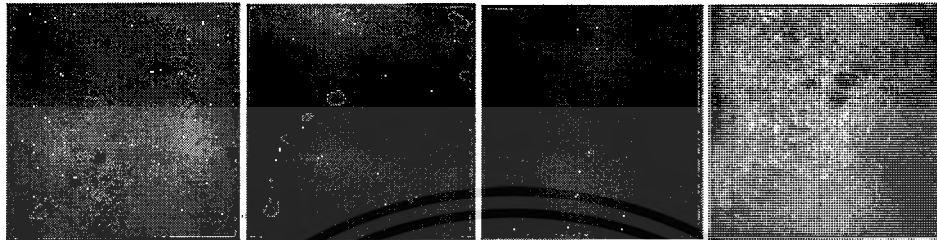
ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อ ไอโซเลต BNR8-11-5และBNR8-11-3เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Laceyella*

TAXA	BNR8-11-5	BNR8-11-3	AF138737	AF138739	AF138734	AF138736	FJ426598	AF138733	AF138735	X60646	AB088364	AB088362	DQ119659	AM940019	AB239529	AB239532	AB049939
BNR8-11-5	100	100	98.72	93.65	93.82	99.04	98.39	93.29	89.42	85.56	89.15	89.36	89.54	89.05	89.68	90.06	87.76
BNR8-11-3	100	100	98.72	93.65	93.82	99.04	98.39	93.29	89.42	85.56	89.15	89.36	89.54	89.05	89.68	90.06	87.76
AF138737	98.72	98.72	100	94.18	94.36	98.39	99.68	94	89.64	86.18	88.6	88.63	88.81	88.69	89.72	89.7	87.77
AF138739	93.65	93.65	94.18	100	99.36	93.65	93.83	92.98	89.98	85.59	91.43	92.12	91.94	90.06	91.03	91.02	87.8
AF138734	93.82	93.82	94.36	99.36	100	93.83	94	93.32	89.43	85.01	91.78	92.12	91.94	90.41	91.38	91.37	87.43
AF138736	99.04	99.04	98.39	93.65	93.83	100	98.06	92.77	89.98	86.34	88.41	89.37	88.81	88.51	90.24	90.61	88.51
FJ426598	98.39	98.39	99.68	93.83	94	98.06	100	93.81	89.43	85.96	88.38	88.23	88.41	88.48	89.51	89.5	87.55
AF138733	93.29	93.29	94	92.98	93.32	92.77	93.81	100	87.94	85.56	91.6	90.87	91.05	92.7	91.37	91.35	90.01
AF138735	89.42	89.42	89.64	89.98	89.43	89.98	89.43	87.94	100	84.52	85.83	86.21	85.62	86.33	88.35	88.33	87.06
X60646	85.56	85.56	86.18	85.59	85.01	86.34	85.96	85.56	84.52	100	84.82	85.75	85.55	86.28	87.69	87.67	83.09
AB088364	89.15	89.15	88.6	91.43	91.78	88.41	88.38	91.6	85.83	84.82	100	97.39	97.89	93.06	88.31	88.69	86.3
AB088362	89.36	89.36	88.63	92.12	92.12	89.37	88.23	90.87	86.21	85.75	97.39	100	99.52	91.98	88.09	88.47	86.29
DQ119659	89.54	89.54	88.81	91.94	91.94	88.81	88.41	91.05	85.62	85.55	97.89	99.52	100	92.33	87.52	87.9	85.7
AM940019	89.05	89.05	88.69	90.06	90.41	88.51	88.48	92.7	86.33	86.28	93.06	91.98	92.33	100	91.87	92.23	87.49
AB239529	89.68	89.68	89.72	91.03	91.38	90.24	89.51	91.37	88.35	87.69	88.31	88.09	87.52	91.87	100	99.68	85.64
AB239532	90.06	90.06	89.7	91.02	91.37	90.61	89.5	91.35	88.33	87.67	88.69	88.47	87.9	92.23	99.68	100	86.03
AB049939	87.76	87.76	87.77	87.8	87.43	88.51	87.55	90.01	87.06	83.09	86.3	86.29	85.7	87.49	85.64	86.03	100

## ภาคผนวก ฉ

### รูปผลการวิเคราะห์ Polar lipid บนแผ่น silica TLC

BNR8-1



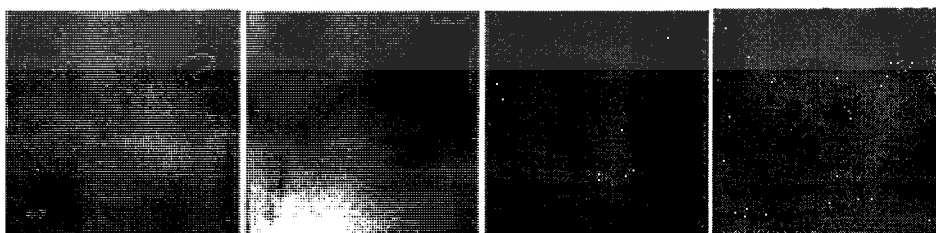
Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

BNR7-1



Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

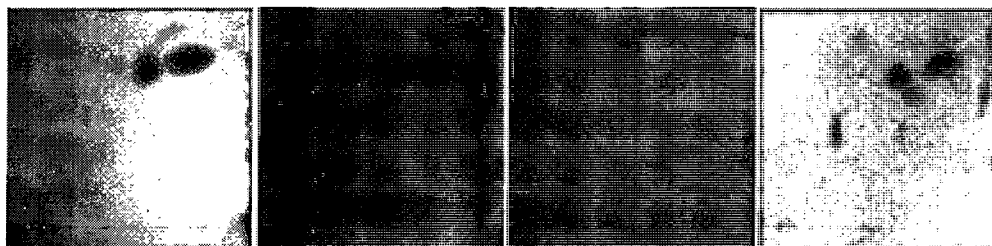
HSS5-1



Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

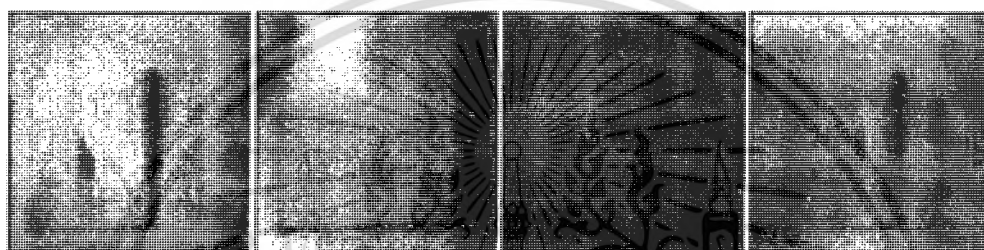
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BNR2-13-1



Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

BNR8-11-5



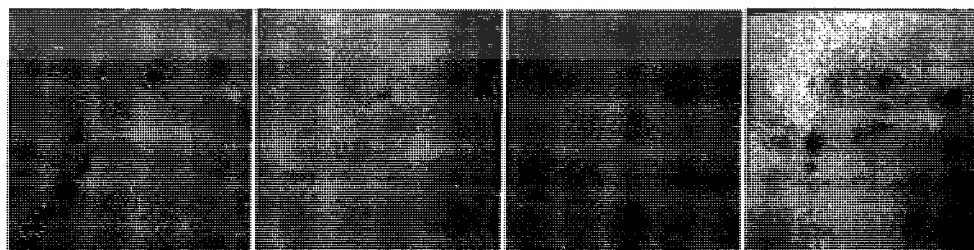
Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

BNR8-11-3



Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

HSS6-8



Ninhydrin reagent    Anisaldehyde reagent    Dragendorff's reagent    Dittmer&Lester reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้