

แอคติโนมัยสีทที่ชอบความเป็นกรดและความเป็นกลางที่แยกได้
จากป่าพรุและกิจกรรมทางชีวภาพของเชื้อเหล่านั้น

ACIDOPHILIC AND NEUTROPHILIC ACTINOMYCETES
ISOLATED FROM PEAT SWAMP FOREST SOIL AND
THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES



ศศิธร พุ่มเพ็ชร
สุพิชชา มาไทย
สุโลมาน บินมามะ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรมอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2561
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACIDOPHILIC AND NEUTROPHILIC ACTINOMYCETES
ISOLATED FROM PEAT SWAMP FOREST SOIL AND
THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2561

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	แอคติโนมัยสีที่ชอบความเป็นกรดและความเป็นกลางที่แยกได้จากป่าพรุและกิจกรรมทางชีวภาพของเชื้อเหล่านั้น Acidophilic and Neutrophilic Actinomycetes Isolated from Peat Swamp Forest Soil and Their Biological Activities
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ศศิธร พุ่มเพชร รหัสนักศึกษา 58050978 นางสาว สุพิชชา มาไทย รหัสนักศึกษา 58051000 นาย สุธาيمان บินมามะ รหัสนักศึกษา 58051004
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. คณิศร กุลนาคะ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินตมัย กรรมการ	
รศ.ดร. จิตติ ท่าไว กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	แอดติโนมัยสิทธิ์ที่ขอความเป็นกรดและความเป็นกลางที่แยกได้ จากป่าพรุและกิจกรรมทางชีวภาพของเชื้อเหล่านั้น
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ศศิธร พุ่มเพชร รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๐๙๗๘ นางสาว สุพิชชา มาไทย รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๑๐๐๐ นาย สุไลมาน บินมามะ รหัสนักศึกษา ๕๘๐๕๑๐๐๔
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	๒๕๖๑
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว

บทคัดย่อ

แอดติโนมัยสิทธิ์ทั้งหมด ๔๓ ไอโซเลต แยกได้จากตัวอย่างดินป่าพรุที่เก็บจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส (๒๐ ไอโซเลต) และป่าพรุลานควาย จังหวัดปัตตานี (๒๓ ไอโซเลต) จากการศึกษาลักษณะการเจริญพบว่าเป็นแอดติโนมัยสิทธิ์ที่ขอความเป็นกรด ๑๕ ไอโซเลต และเป็นแอดติโนมัยสิทธิ์ที่ขอความเป็นกลาง ๒๘ ไอโซเลต แอดติโนมัยสิทธิ์ทั้งหมดนี้ถูกนำมาคัดกรองกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียและรา จากนั้นคัดเลือกแอดติโนมัยสิทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ที่ดีมาประเมินกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีอาร์การเวลดิฟฟิวชันและวิธีการเลี้ยงร่วม พบว่าแอดติโนมัยสิทธิ์ ๕ ไอโซเลต ได้แก่ พีทีดี ๔-๒๙ พีทีดี ๖-๓๑ พีทีดี ๙-๑๐ พีแอลเค ๑-๕ และพีแอลเค ๓-๗๑ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างน้อย ๒ ชนิด โดยส่วนมากสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้และพบว่าแอดติโนมัยสิทธิ์ ๘ ไอโซเลต (ร้อยละ ๑๘.๖) สามารถต่อต้านการเจริญของราได้ โดยไอโซเลตพีทีดี ๕-๙ และพีทีดี ๘-๘ แสดงการยับยั้งการเจริญได้สูงมากกว่า ๗๐ เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการต่อต้านรา *ฟิวซาเรียม* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แอดติโนมัยสิทธิ์ที่ถูกคัดเลือก ๑๕ ไอโซเลต ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ทางชีวภาพถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง ๑๖ เอส อาร์อาร์เอ็นเอ พบว่าไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกเป็นสมาชิกในสกุล *สเตรปโตมัยเซส* *ไมโครโมโนสปอร์รา* และ *ไมโครไบสปอร์รา* โดยไอโซเลต พีทีดี ๕-๙ และพีทีดี ๘-๘ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุด มีความใกล้เคียงกับ *สเตรปโตมัยเซส* *เจลาติคัส* และ *สเตรปโตมัยเซส* *มิลิโอเนนซิส* ที่ระดับความคล้ายคลึง ๙๙.๓ และ ๙๙.๕ ตามลำดับ นอกจากนี้ไอโซเลต พีทีดี ๙-๑๐ ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความใกล้เคียงกับ *สเตรปโตมัยเซส* *ซาเซ* มากที่สุดที่ระดับความคล้ายคลึง ๙๘.๗ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับค่าบ่งบอกความเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนั้นไอโซเลตนี้จึงถูกพิจารณาว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *สเตรปโตมัยเซส*

คำสำคัญ: แอดติโนมัยสิทธิ์, ป่าพรุ, กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค, กิจกรรมการต้านรา, *ฟิวซาเรียม*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Acidophilic and Neutrophilic Actinomycetes Isolated from Peat Swamp Forest Soil and Their Biological Activities		
Students	Miss Sasitorn	Pumpeth	Student ID 58050978
	Miss Supitcha	Mathai	Student ID 58051000
	Mr. Sulaiman	Binmama	Student ID 58051004
Degree	Bachelor of Science (Industrial microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang		
Academic Year	2561		
Advisor	Assoc. Prof. Chitti Thawai		

Abstract

Forty-three actinomycete isolates were isolated from peat swamp forest soil samples collected from To Daeng (20 isolates), Narathiwat province and Lan Kwai (23 isolates), Pattani province. The result of cultural study revealed that fifteen isolates were assigned to be acidophilic actinomycetes and the remaining twenty-eight isolates were neutrophilic actinomycetes. All of actinomycetes were screened for anti-bacterial and anti-fungal activities. The selected actinomycete isolates were investigated for anti-bacterial and anti-fungal activities using agar well diffusion and dual culture methods, respectively. The results showed that 5 isolates, PTD4-29, PTD6-31, PTD9-10, PLK1-5, and PLK3-71 exhibited the strong anti-bacterial activity which could inhibit at least 2 pathogenic bacteria (mostly inhibit Gram-positive bacteria). For anti-fungal activity, 8 isolates (18.6%) exhibited the anti-fungal activity against *Fusarium* sp. Among of these, isolates PTD5-9 and PTD8-8 showed the significant anti-fungal activity (> 70% inhibition percentage).

Fourteen isolates exhibiting the unique morphological property and biological activities were selected to analyze the 16S rRNA gene by sequencing method. The results revealed that the isolates were the member of *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Microbispora*. The potential isolates, PTD5-9 and PTD8-8 exhibited the closest relationship to *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928^T (99.3% 16S rRNA gene sequencing similarity) and *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T (99.5% 16S rRNA gene sequencing similarity), respectively. Furthermore, isolate PTD9-10 were closely related to *Streptomyces sasae* JR-39^T (98.7% 16S rRNA gene sequencing similarity) which was equal or less than the cut-off point for assigning the new bacterial species. Therefore, this isolate was considered to be a new species in the genus *Streptomyces*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: Actinomycetes, Peat swamp forest, antimicrobial activity, antifungal activity, *Fusarium* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์หลายๆท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาในการทำโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ ปริญญาโทและเอกที่หน่วยวิจัยทางแอคติโนมัยแบคทีเรียทุกคนที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้อำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านของการใช้สถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำ

ขอขอบคุณสมาชิกในกลุ่มทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำโครงการพิเศษและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างเต็มที่จนสำเร็จและลงไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบคุณพระคุณ บิดา มารดา และพี่น้องในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนทุกด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ศศิธร พุ่มเพชร
สุพิชชา มาไทย
สุไธมาน บินมามะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท	3
2.1.1 สารปฏิชีวนะที่ใช้	3
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....	3
2.1.3 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ	4
2.2 ปาพร.....	6
2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีท	7
2.4 หลักการทดสอบอนุกรมวิธานเบื้องต้น.....	7
2.4.1 ปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR).....	7
2.4.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	7
2.4.3 ขั้นตอนในการทำปฏิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	8
2.5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 เครื่องมือและวิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	10
3.2 สารเคมี.....	10
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	11
3.4 การเก็บตัวอย่างดิน	11
3.5 การปรับสภาพตัวอย่างดินและการแยกแอคติโนมัยสีท.....	12
3.5.1 การปรับสภาพตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคความร้อนแห้ง	12
3.5.2 การปรับสภาพตัวอย่างดินโดยเทคนิคความร้อนเปียก	12
3.6 การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทและการทำให้บริสุทธิ์.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การเก็บรักษาแอสโคสปอร์.....	12
3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	13
3.8.1 การคัดเลือกไฮโฟเลตแอสโคสปอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นด้วยวิธี Agar cross streak.....	13
3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion	13
3.8.3 การทดสอบความสามารถในการต้านราก่อโรคในพืชด้วยวิธี Dual culture .	13
3.9 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอสโคสปอร์.....	14
3.9.1 การศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์	14
3.9.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญของแอสโคสปอร์.....	14
3.9.1.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา.....	14
3.9.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์.....	14
3.9.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการทำให้บริสุทธิ์	14
3.9.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)	15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	16
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างและการแยกแอสโคสปอร์จากดินป่าพรุ	16
4.2 ผลการคัดเลือกและจัดกลุ่มแอสโคสปอร์.....	18
4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอสโคสปอร์.....	18
4.2.2 ผลการจัดกลุ่มแอสโคสปอร์ตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ	42
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	45
4.3.1 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobial activity)	45
4.3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านราก่อโรคในพืช (antifungal activity)	47
4.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอสโคสปอร์ที่คัดเลือก.....	49
4.4.1 วงศ์ <i>Micromonosporaceae</i>	51
4.4.2 วงศ์ <i>Streptosporangiaceae</i>	55
4.4.3 วงศ์ <i>Streptomyetaceae</i>	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	79
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	84
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	85
ภาคผนวก ข สารเคมี	87
ภาคผนวก ค กระดาษสีมาตรฐาน	88
ภาคผนวก ง ภาพแสดงไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา <i>Fusarium</i> sp.	101
ภาคผนวก จ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอสโคดีโนไมยสีที่คัดเลือก	102
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี maximum likelihood.....	112
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี maximum parsimony.....	126



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR).....	15
3.2 สภาพในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR).....	15
4.1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง ลักษณะดิน อุณหภูมิของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน และไอโซเลตของแอคติโนมัยสีที่คัดแยกได้	16
4.2 แสดงกลุ่มแอคติโนมัยสีตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ	42
4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีด้วยวิธี Agar well diffusion	46
4.4 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านราด้วยวิธี Dual culture.....	47
4.5 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene (%similarity) ของแอคติโนมัยสีที่แยกได้เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูล	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของนิสตาติน (nystatin).....	5
2.2 โครงสร้างของพอลิออกซิน (polyoxin).....	6
2.3 วงจรปฏิกิริยาฟิซีอาร์.....	8
4.1 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD4-11	18
4.2 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD5-6	19
4.3 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD5-9	19
4.4 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD6-13	20
4.5 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD9-10	20
4.6 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-5.....	21
4.7 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-71.....	21
4.8 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-34.....	22
4.9 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-38.....	22
4.10 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-39	23
4.11 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-44	23
4.12 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD4-29.....	24
4.13 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD6-31.....	24
4.14 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD7-11.....	25
4.15 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-10.....	25
4.16 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD4-13.....	26
4.17 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD4-16.....	26
4.18 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-4.....	27
4.19 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD9-4.....	27
4.20 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-1	28
4.21 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-7	28
4.22 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-12.....	29
4.23 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-35.....	30
4.24 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-54.....	30
4.25 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-8.....	31
4.26 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-8	32
4.27 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-45.....	32
4.28 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-9.....	33
4.29 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-21.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวทสวไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.30 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-37.....	34
4.31 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD8-41.....	34
4.32 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-29.....	35
4.33 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-34.....	35
4.34 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-94.....	36
4.35 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-115.....	36
4.36 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK4-13.....	37
4.37 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-60.....	38
4.38 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PTD9-3.....	39
4.39 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK1-6.....	39
4.40 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-27.....	40
4.41 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK3-28.....	40
4.42 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK5-43.....	41
4.43 แสดงลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PLK6-77.....	41
4.44 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PLK3-29.....	51
4.45 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-29 บน Phylogenetic tree.....	52
4.46 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PLK6-60.....	53
4.47 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-60 บน Phylogenetic tree.....	54
4.48 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD9-3.....	55
4.49 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-3 บน Phylogenetic tree.....	56
4.50 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PLK5-43.....	57
4.51 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK5-43 บน Phylogenetic tree.....	58
4.52 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD4-29.....	59
4.53 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD4-29 บน Phylogenetic tree.....	60
4.54 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD5-9.....	61
4.55 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD5-9 บน Phylogenetic tree.....	62
4.56 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD6-31.....	63
4.57 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD6-31 บน Phylogenetic tree.....	64
4.58 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD8-8.....	65
4.59 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-8 บน Phylogenetic tree.....	66
4.60 แสดงลักษณะทางฟิโนไทป์ของไอโซเลต PTD8-35.....	67
4.61 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-35 บน Phylogenetic tree.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 4.61 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-35 บน Phylogenetic tree..... 68
 ไม่วารณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.62 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต PTD9-10	69
4.63 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-10 บน Phylogenetic tree.....	70
4.64 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK1-5	71
4.65 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK1-5 บน Phylogenetic tree	72
4.66 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK3-71	73
4.67 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-71 บน Phylogenetic tree	74
4.68 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK6-34	75
4.69 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-34 บน Phylogenetic tree	76
4.70 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของไอโซเลต PLK6-54	77
4.71 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-54 บน Phylogenetic tree	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ป่าพรุ (Peat swam forest) คือป่าไม้ไม่ผลัดใบชนิดพิเศษที่เกิดขึ้นในพื้นที่ลุ่มน้ำจืด มีการท่วมขังของน้ำตลอดทั้งปี เป็นสถานที่ที่สร้างความหลากหลายทางชีวภาพให้กับระบบนิเวศเนื่องจากดินมีการสะสมของซากอินทรีย์วัตถุ (peat) เช่น ซากสัตว์ เศษไม้และใบไม้เป็นเวลานาน ทับถมกันเป็นชั้นหนา ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้มีการสลายตัวช้าและมีสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดสูง มีน้ำท่วมขัง สารอาหารมีอย่างจำกัด อินทรีย์วัตถุส่วนใหญ่จะจมอยู่ใต้ผิวน้ำ เราเรียกดินชนิดนี้ว่า ดินอินทรีย์ (organic soil) ซึ่งเป็นดินที่มีลักษณะสีน้ำตาลน้ำหนักเบาและอุ้มน้ำได้ดี ทำให้เกิดการยุบตัวลงได้ง่าย ส่วนพื้นดินชั้นล่างหรือพื้นดินเดิมจะมีลักษณะเป็นดินตะกอนเลน มีสารประกอบพวกกำมะถันซึ่งมีความเป็นกรดสูง น้ำในป่าพรุมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 3.7-6.4 โดยเฉพาะฤดูแล้งน้ำในพื้นที่ป่าพรุจะมีค่าความเป็นกรดค่อนข้างสูง มีออกซิเจนละลายอยู่ค่อนข้างต่ำ สัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในป่าพรุจึงต้องมีการปรับตัวเป็นอย่างมากที่จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำดังกล่าว แต่เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนปริมาณน้ำที่ไหลเข้าป่าพรุมีปริมาณมากขึ้น ค่าความเป็นกรดก็จะลดลง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเพิ่มสูงขึ้น ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำจึงเพิ่มมากขึ้น ป่าพรุเป็นป่าที่มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว ดังนั้นจึงเป็นแหล่งธรรมชาติที่น่าสนใจสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่มีสภาพเป็นกรด อาจทำให้มีโอกาสนในการค้นพบแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ใหม่รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ

แอคติโนมัยซีท์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) บนสายดีเอ็นเอในระดับสูง สามารถสร้างเส้นใยและสปอร์ได้คล้ายกับรา แต่เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) และมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างจากรา แอคติโนมัยซีท์สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน แหล่งน้ำจืด มหาสมุทร ทะเลทราย เนื้อเยื่อพืช สิ่งปฏิกูลหรือของเสียต่างๆ โดยจะสามารถพบแอคติโนมัยซีท์ได้มากที่สุด在地ดิน แอคติโนมัยซีท์สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดีและทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ไม่มากนัก จึงพบแอคติโนมัยซีท์ได้มากในดินที่มีความเป็นกลางถึงด่าง ส่วนในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินต่ำกว่า 5 พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อแอคติโนมัยซีท์อาจลดลงเหลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากแอคติโนมัยซีท์ที่ชอบความเป็นกลาง (Neutrophilic actinomycetes) ยังสามารถพบแอคติโนมัยซีท์บางส่วนที่ชอบความเป็นกรด (acidophilic actinomycetes) ซึ่งแอคติโนมัยซีท์ที่ชอบความเป็นกรดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ neutrotolerant acidophiles และ strictly acidophiles โดยปกติแล้ว neutrotolerant acidophiles สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5-7.5 และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0-5.5 ส่วน สมาชิกของกลุ่ม strictly acidophiles สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5-6.5 และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ซึ่งในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดมักจะพบแอคติโนมัยซีท์สกุล *สเตรปโตไมเซส (Streptomyces)*

ความสำคัญของแอคติโนมัยซีท์นั้นเป็นที่ทราบกันดีว่ามีบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลายทางชีวภาพและมีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย รวมถึงมีกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น antibiotic, antitumor และเอนไซม์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในด้านการแพทย์ การเกษตรและอุตสาหกรรม โครงการพิเศษนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมทางชีวภาพในด้านของการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราก่อโรค

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรดและมีกิจกรรมทางชีวภาพต่อแบคทีเรียและราก่อโรคได้
- 2) เพื่อทดสอบกิจกรรมทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่มีต่อแบคทีเรียและราก่อโรค
- 3) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอคติโนมัยสีทที่มีกิจกรรมทางชีวภาพต่อแบคทีเรียและราก่อโรค รวมถึงแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะพื้นฐานวิทยาที่น่าสนใจ นำมาสกัดดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อระบุชนิดของแอคติโนมัยสีท

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุจำนวน 2 แหล่ง คือ ป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสุไหงโกลลก จังหวัดนราธิวาส และป่าพรุลานควาย อำเภอทุ่งยางแดง จังหวัดปัตตานี
- 2) จัดกลุ่มของ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้
- 3) ทดสอบกิจกรรมทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่มีต่อแบคทีเรียและราที่ก่อโรค
- 4) ตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อแบคทีเรียและราก่อโรค รวมถึงแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่ชอบความเป็นกรดและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราที่ก่อโรค
- 2) งานวิจัยครั้งนี้อาจพบแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งแบคทีเรียและราก่อโรคได้หลายชนิด
- 3) สามารถเป็นแนวทางให้กับผู้ที่สนใจนำไปพัฒนาเพื่อต่อยอดในการใช้ประโยชน์สำหรับอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) บนสายดีเอ็นเอในระดับสูง อยู่ที่ 55-75% (Lo และคณะ, 2002) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถสร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนงหรือมีรูปทรงต่าง โดยทั่วไปแล้วเส้นใยจะไม่มีผนังกัน (septa) ถ้าหากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถแสดงให้เห็นได้ในบางรูปแบบ (Hotam และคณะ, 2013) ผนังกันเส้นใยจะทำหน้าที่ในการแบ่งเส้นใยออกเป็นเซลล์ยาว (ขนาด 20 มิลลิเมตร หรือยาวกว่านั้น) ที่ภายในมีโครโมโซมจำนวนมาก (nucleoids) เส้นใยทำหน้าที่สร้างสปอร์อาจจะมีการแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง โดยเส้นใยที่แตกแขนงจะมีรูปร่างตรงหรือเป็นเกลียว สปอร์มีทั้งเป็นทรงกลม ทรงกระบอกหรือรูปไข่ และมีการสร้างสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ สปอร์จะสร้างบนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งสปอร์มีทั้งแบบที่ไม่มีกึ่งหุ้ม (conidia) เป็นเม็ดเดี่ยวที่เรียงต่อกันเป็นเส้นสายและแบบที่ถูกสร้างขึ้นให้อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีท คือ โครงสร้างแข็งที่ใช้รักษารูปทรงของผนังเซลล์และเซลล์ของแอกติโนมัยสีท รวมถึงป้องกันการแตกของเซลล์เนื่องจากแรงดันออสโมติกที่สูง (Manuselis และ Mahon, 2007 ; Goodfellow และคณะ, 1998) ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนมากมายรวมถึง peptidoglycan, teichoic, teichuronic acid และ polysaccharides โดย peptidoglycan ประกอบด้วย glycan (polysaccharides) ที่สลับกันกับ N-acetyl-d-glucosamine (NAG) และ N-acetyl-d-muramic acid (NAM) และ diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ในผนังเซลล์ของ prokaryotic ส่วน Teichoic และ teichuronic acid นั้น จะสร้างพันธะกับ peptidoglycan (Manuselis และ Mahon, 2007 ; Davenport และคณะ, 2000) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยสีทมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมบวก แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา(เส้นใย) และลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการพัฒนาเป็นอย่างดียิ่งถูกแยกเป็นอีกกลุ่มจากแบคทีเรียอื่น ๆ ทั่วไป (Das และคณะ, 2008 ; Cummins และ Harris, 1954)

2.1.1 สารปฏิชีวนะที่ใช้

สารปฏิชีวนะที่ใส่ลงในอาหารแยกเชื้อนั้นมีหน้าที่ช่วยกำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้ดีขึ้น เนื่องจากแอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญเติบโตช้า ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่นิยมใส่ในอาหารมักเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ เช่น นิสเตติน (nystatin) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโคลเฮกซอไมด์ (cycloheximide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (Thawai และคณะ, 2014)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท

การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของสปอร์ ลักษณะของเส้นใย ทั้งเส้นใยใต้อาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนืออาหารหรือเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) นอกจากนี้ยังใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์มาใช้ในการจัดจำแนก เช่น ชนิดของกรดไดอะมิโนไพเมลิก (diaminopimelic acid หรือ DAP) ที่ผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลภายในไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และเมนาควิโนน (menaquinone) เป็นต้น (Yamaguchi, 1965 ; Yamada, 1998) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการอาศัยกล้องจุลทรรศน์ และเลนส์ที่มีระยะการทำงานยาว (long working distance) โดยดูลักษณะของเชื้อที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจำแนกเป็นสกุล (Holt และคณะ, 1994) ได้แก่

1. เส้นใย (mycelium) โดยแบ่งออกเป็น เส้นใยได้อาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนืออาหาร (aerial mycelium) โดยพิจารณาว่าสร้างแบบใดหรือสร้างทั้งสองแบบ โดยปกติเชื้อจะสร้างเส้นใยชนิดใด ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ มีบางชนิดเท่านั้นที่สร้างเฉพาะเส้นใยเหนืออาหาร บางชนิดเส้นใยมีลักษณะเป็นถุงเล็กๆ (vesicle) และไม่สร้างสปอร์ เส้นใยอาจแข็งแรงหรือมีการแตกหัก บางชนิดเส้นใยที่แตกหักสามารถเคลื่อนที่ได้

2. โคนิเดียม (conidium) คือสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ โดยแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างโคนิเดียม (conidium) ได้หลายแบบดังนี้

ก. โคนิเดียมเป็นสปอร์เดี่ยว ๆ (single conidium) มักพบโดยทั่วไปโดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* บางชนิดมีเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนความร้อนได้ดี แต่บางชนิดไม่ทนร้อน

ข. โคนิเดียมแบบคู่ (pairs of conidia) มีลักษณะเรียงตัวตามยาว สร้างอยู่บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ได้แก่ *Microbispora* และ *Planobispora*

ค. โคนิเดียมที่เรียงตัวเป็นสายสั้น (short chain of conidia) โคนิเดียมลักษณะนี้ยากที่จะบอกได้ว่ามีจำนวนสปอร์อยู่เท่าไร แต่จะพิจารณาว่าถ้ามีการเรียงตัวของสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์จัดว่าเป็นสายสั้น โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้างสปอร์สั้นๆ และมีถุงมาล้อมรอบ อาจสร้างอยู่บนเส้นใยที่เจริญอยู่ใต้ผิวหน้าอาหาร หรือเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศก็ได้

ง. เป็นโคนิเดียม (conidium) ที่เรียงตัวเป็นสายยาว (long chain of conidia) โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้างโคนิเดียมที่สามารถเคลื่อนที่ได้

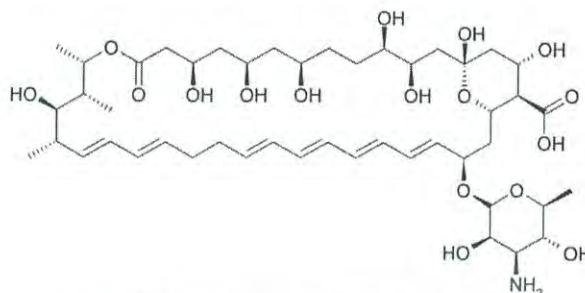
3. อับสปอร์ (sporangium) เป็นถุงที่บรรจุสปอร์ไว้ภายใน อาจสร้างอยู่บนเส้นใยที่เจริญอยู่ใต้ผิวหน้าอาหาร หรือเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศก็ได้ บางชนิดอาจสร้างอยู่ในเนื้อวุ้น

4. โครงสร้างอื่น ๆ แอคติโนมัยซีทบางชนิดสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะพิเศษต่าง ๆ เช่น เชื้อบางสกุลสร้างกลุ่มของสปอร์ที่แกนของเส้นใย ซึ่งเป็นการสร้างสปอร์แบบที่อับสปอร์จะประกอบด้วยหลายเซลล์ (multilocular sporangium) แอคติโนมัยซีทหลายชนิดสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะกลม ขนาดไม่ใหญ่นักบนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ มีลักษณะเป็นเส้นใยที่ม้วนตัวบิดเป็นวงกลมในสายสปอร์ หรือโครงสร้างนี้อาจมีเส้นใยฝังลงในโครงสร้างที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เช่น ปีกไยรา (sclerotia) ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดย *Streptomyces* บางชนิด โดยจะไม่มีสปอร์อยู่ภายในแต่จะมีไขมันอยู่แทน

2.1.3 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ เนื่องจากมีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส เป็นต้น โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้มากถึง 2 ใน 3 ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่เรารู้จักกันในปัจจุบัน โดยเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์สร้างมาจาก *Streptomyces* นอกจากนี้สามารถนำมาผลิตยาต่างๆ เช่น สารที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ นิสตาติน (nystatin) พอลิออกซิน (polyoxin) และแอนทราไมวาล์น (antracycline) ซึ่งล้วนมีพิษต่อเซลล์ของเชื้อราและต้องอาศัยการนำเข้าไปใช้

ราไซคลิน (anthracycline) เป็นต้น สารกดภูมิคุ้มกัน เช่น ราพาไมซิน (rapamycin) และสารต่อต้านมะเร็ง เช่น ลิโมโครซิน (limocrocin) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของนิสตาติน (nystatin)

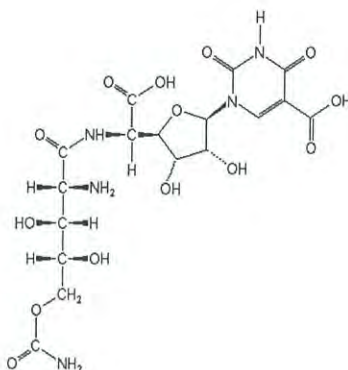
ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nystatin.png>

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังผลิตสารกำจัดแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Waksman และ Lechevalier 1962 ; Goodfellow และคณะ, 1988 ; Lazzarini และคณะ, 2000)

จากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด พบว่ามาจากเชื้อรา 42% *Streptomyces* 32.1% แบคทีเรียอื่นๆ 10.8% และแอคติโนมัยสีทที่หายาก 15.1% ถ้าพิจารณาเฉพาะสารต่อต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด พบว่าผลิตจาก *Streptomyces* 45.6% เชื้อรา 21.5% แบคทีเรีย 16.9% และแอคติโนมัยสีทที่หายาก 16% ซึ่งแบ่งเป็น *Micromonosporaceae* 38.1 % *Pseudonocardaceae* 15% *Thermomonosporaceae* 14% *Nocardia* 11% *Streptosporangiaceae* 6% *Nocardioideae* 2.6% และอื่นๆ อีก 13.3% (Lazzarini และคณะ, 2000)

สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin) และเพนิซิลลิน-เอ็น (penicillin-N) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β -lactam) ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเพปทิโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. clavuligerus* สามารถผลิตคลาแวม (clavams) (Muller และคณะ, 1983) ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้าแลคทาเมส (β -lactamase) ที่ผลิตโดย สแตปไฟโรคอคไค (*Staphylococci*) และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนสเตรปโตไมซิน (streptomycin) ที่ผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และ นีโอไมซิน (neomycin) ที่ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman และคณะ, 1964) ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งและรูปกลมบางชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางประเภท และยังมีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ด้วยสารที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ นิสตาติน (nystatin) พอลิออกซิน (polyoxin) และ แอนทราไซคลิน (anthracycline)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของพอลิออกซิน (polyoxin)

ที่มา: <http://www.alanwood.net/pesticides/polyoxorim.html>

สำหรับ anthracyclin นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้อีกด้วย โดยไปยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้ (Goodfellow และคณะ, 1988) สารต่อต้านเชื้อราและยีสต์ที่พบใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม polyene (Ball และคณะ, 1957) มีสมบัติต่อต้านเชื้อราและยีสต์ แต่มักไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Norman และคณะ, 1972) โดยมีกลไกในการเข้าทำลายเชื้อราและยีสต์ได้ด้วยการเข้าไปจับกับสเตอรอล (sterol) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ดังนั้นเซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ (Hamilton-Miller, 1973) สารต่อต้านเชื้อราที่พบใน *Streptomyces* มีหลายชนิด เช่น บลาสติซิน เอส (blastidicin s) ผลิตโดย *S. griseochromogens* (Takeuchi และคณะ, 1958) คาซูกะมายซิน (kasugamycin) ผลิตโดย *S. kasugaensis* (Sato, 1983) และพอลิออกซิน ดี (polyoxin D) ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* (Isono และ Suzuki, 1979) เป็นต้น

2.2 ป่าพรุ

ป่าพรุ (Peat Swamp forest) เป็นป่าที่เป็นที่ลุ่มชุ่มน้ำหรือมีน้ำจืดแช่ขังขึ้นอยู่ในพื้นที่เป็นแอ่งรูปกระทะ ได้รับน้ำจากฝนเป็นส่วนใหญ่ทำให้มีน้ำจืดแช่ขังตลอดปี มีซากพืชทับถมกันเป็นเวลานานโดยผุสลาย ซ้ำมาก และมักขังติดต่อกันเป็นเวลานานอาจมีการแห้งแล้งในบางครั้งแต่ดินยังคงชื้นจัด มีซากพืชของพืชที่ทับถมหนา เวลาเหยียบมีความหยุ่น สภาพดินพรุมีการทับถมของซากพืช เรียกว่า ดินอินทรีย์ (organic soils) หรือดินชุดนราธิวาส (Narathiwat series) ซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมถ้าหากสลายหมดจนไม่เห็นซากพืชเรียก มัค (muck) ถ้าสลายไม่หมดมองเห็นซากพืชเรียก พีท (peat) ดินพรุส่วนใหญ่หนามากกว่า 40 เซนติเมตร บางแห่งอาจถึง 2 เมตร มีสีดำหรือน้ำตาลแก่ ดินเป็นกรดปานกลางในชั้นบนและกรดจัดในชั้นล่าง ตามปกติค่า ความเป็นกรด-ด่างของดินจะแปรผันอยู่ในช่วง 4.5-6.0 ซึ่งลักษณะการทับถมของอินทรีย์สารจำนวนมากในป่าพรุผู้วิจัยจึงคาดว่าป่าพรุน่าจะเป็นแหล่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่มีความหลากหลาย เป็นจำนวนมากและคาดว่าน่าจะเป็นแหล่งที่พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญจากจุลินทรีย์แอคติโนมัยซีท์ที่น่าสนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอดดีโนมายีส

การพิสูจน์และจำแนกแอดดีโนมายีสในระดับสปีชีส์อาศัยข้อมูลทางด้าน 16S rRNA หลักการจำแนกแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอเทคโนโลยี สามารถแบ่งกลุ่มเป็นสปีชีส์โดยใช้ผลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกด้วยลักษณะทางจีโนมได้โดยมีเป้าหมายที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด คือ rRNA Operon ที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงในแบคทีเรีย ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอ ชนิด 16S, 23S และ 5S (Barry และคณะ, 1991) เรียงลำดับตามการ transcription จาก 5' ไป 3' คือ 16S rRNA, spacer, tRNA, spacer, tRNA, spacer, 23S rRNA

ยีน 16S rRNA เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ได้รับการยอมรับโดยนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ (species) จีนัส (genera) และแฟมิลี (families) มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (Gürtler และ Stanisich, 1996) แปรผันทางวิวัฒนาการน้อยมาก (Janda และ Abbott, 2007) มีฐานข้อมูลที่มีความแม่นยำเพื่อการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) มีรายงานความแตกต่างของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียกว่า 2,500 สปีชีส์ (Gürtler และ Stanisich, 1996) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA operon ที่สมบูรณ์บนฐานข้อมูล 144 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Barry และคณะ, 1991) ยีน 23S rRNA ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยกว่ายีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ ประมาณ 3 กิโลเบส ฐานข้อมูลการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการของ 23S rRNA ยังไม่สมบูรณ์ ไม่เพียงพอในการเปรียบเทียบ ส่วนยีน 5S rRNA มีขนาดเล็กประมาณ 1.2 กิโลเบส ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยมากเนื่องจากมีขนาดเล็กและนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ไม่ได้ (Gürtler และ Stanisich, 1996 ; Barry และคณะ, 1991)

2.4 หลักการทดสอบอนุกรมวิธานเบื้องต้น

2.4.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR)

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจอย่างจำเพาะเจาะจงได้ในปริมาณที่มากกว่าเดิมหลายล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว

เทคนิคพีซีอาร์อาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิต โดยเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ เทคนิคพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ร่วมกับสารเคมีและสารตั้งต้นที่สำคัญหลายชนิด

2.4.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

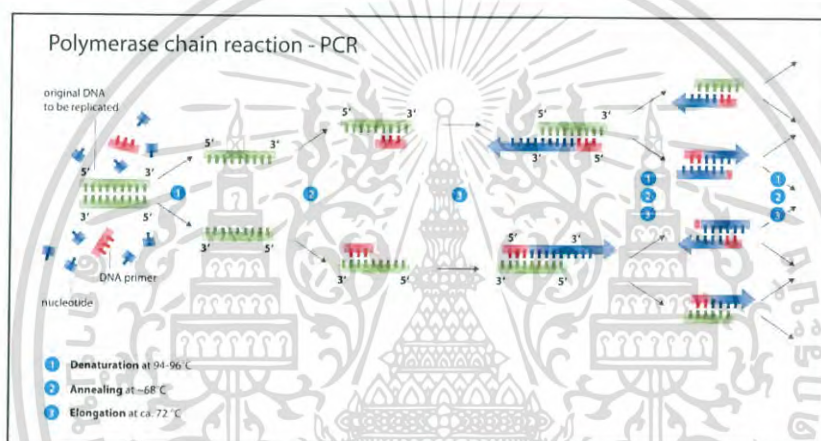
1. DNA template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่
2. PCR buffer ประกอบด้วย Tris-Cl และ KCl pH 8.3
3. dNTP mix
4. Primer คือนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ
5. $MgCl_2$ แมกนีเซียมไอออนทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์เพื่อส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
6. Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนให้ไพรเมอร์สามารถเกาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ตรงบริเวณที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) ใช้อุณหภูมิช่วง 40-65 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนที่ดีเอ็นเอพอลิเมอร์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 72 องศาเซลเซียส

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler, PCR machine หรือ เครื่องพีซีอาร์) สามารถเพิ่มหรือลดอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดไว้และทำงานหมุนเวียนในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension ได้หลายรอบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสิ้นสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ตามที่ต้องการในปริมาณมาก



รูปที่ 2.3 วงจรปฏิกิริยาพีซีอาร์ (<https://en.wikipedia.org>)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับแอคติโนมัยสีทจากป่าพรุในประเทศไทยพบว่าในปี 2004 จิตติ ท่าวัว ได้ศึกษาแอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุจังหวัดตรัง พัทลุง ยะลา และนราธิวาส พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยในสกุล *Micromonospora* ได้จำนวน 52 ไอโซเลต และพบ *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Micromonospora eburnea* (Thawai และคณะ, 2005) *Micromonospora aurantionigra* (Thawai และคณะ, 2004) *Micromonospora siamensis* (Thawai และคณะ, 2005) และ *Micromonospora narathiwatensis* (Thawai และคณะ, 2007) ตามลำดับ และได้พบสารกลุ่ม polyene macrolide lactam ชนิดใหม่คือ Micromonosporin A (9,11,13-trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracos-3,5,7,15,17,19,21-heptaen-2-one) และมีการสร้างสารอนุพันธ์คือ 9,11,13 trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracosan-2-one โดยสารอนุพันธ์ที่เตรียมได้แสดงฤทธิ์ต้าน เชื้อจุลินทรีย์อย่างอ่อนและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1, multidrugresistant strain) ที่ระดับ IC₅₀ = 3.1 microgram/mL และเชื้อวัณโรคที่ระดับ MIC = 50 microgram/mL

การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลใหม่ (new genus) ในปี 2006 ได้มีการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุในจังหวัดพัทลุงและได้มีการค้นพบแอคติโนมัยสีทสกุลใหม่คือ *Actinocatenispora* และมีไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตั้งชื่อว่า *Actinocatenispora thailandica* (Thawai และคณะ, 2006) ต่อมาในปี 2010 ได้มีการค้นพบแอสโคไมซีตสกุลใหม่อีกคือ *Actinaurispora* และตั้งชื่อว่า *Actinaurispora siamensis* (Thawai และคณะ, 2010)

ในปี 2011 ได้มีการตีพิมพ์การค้นพบแอสโคไมซีตชนิดใหม่จากป่าพรุในอุทยานแห่งชาติภูซาง จังหวัดพะเยาและตั้งชื่อว่า *Micromonospora humi* (Songsumanus และคณะ, 2011) จะเห็นได้ว่าป่าพรุของ ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแอสโคไมซีตเป็นอย่างมาก ดังนั้นโอกาสที่จะพบเชื้อแอสโคไมซีตสายพันธุ์ใหม่จึงมีค่อนข้างสูงและเนื่องจากเชื้อแอสโคไมซีตเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีความหลากหลาย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

เครื่องมือและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Air flow Laminar)
2. หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. โกร่งบดสาร (mortar and pestle)
6. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
8. เครื่องผสมสาร (Vortex)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer)
10. เครื่องเขย่า (Shaker)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
12. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
13. เลนส์ส่องระยะไกล (Long-working distance lens)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction machine, Thermal cycler)
15. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometer)
16. ขวดฝาเกลียว (Duran)
17. ปีกเกอร์ (Beaker)
18. หลอดทดลอง (Test tube)
19. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
20. ลูปเย็บเชื้อ (Loop)
21. สวตเย็บเชื้อ (Microneedle)
22. หลอดพลาสติกทนความเย็น (Cryotube)
23. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
24. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper)
25. ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer 5 mm.)
26. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)

3.2 สารเคมี

1. Tween 80
2. Distilled water
3. Sodium lauryl sulfate
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
5. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)
6. Soluble starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Potassium nitrate (KNO_3)
8. Agar
9. Nalidixic acid
10. Nystatin
11. Sodium Hydroxide (NaOH)
12. Glucose
13. Yeast extract
14. Malt extract
15. Mueller-Hinton agar (MHA)
16. Sabouraud dextrose agar (SDA)
17. Potato dextrose agar (PDA)
18. Nutrient agar (NA)
19. Hydrochloric (HCl)
20. Alcohol 95%
21. Alcohol 70%
22. Glycerol
23. Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
24. Ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
25. Primer 9F (Forward)
26. Primer 1541R (Reverse)
27. TBE buffer
28. 6X DNA Loading Dye
29. SYBR® Safe DNA Gel Strain

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE) ATCC 15555
4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
6. *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
7. *Enterococcus faecium* ATCC 51559
8. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654
9. *Candida albicans* ATCC 10231
10. *Fusarium* sp.

3.4 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินป่าพรุทั้งหมด 16 ตัวอย่าง (จากป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสุไหงโกลลก จังหวัดนราธิวาส 10 ตัวอย่างและจากป่าพรุลานควาย อำเภอทุ่งยางแดง จังหวัดปัตตานี 6 ตัวอย่าง) จากนั้นนำตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในห้องปฏิบัติการ โดยผสมตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น ใช้อัตราส่วน 1:2.5 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างดินตกตะกอนและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างบริเวณส่วนน้ำใสโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Poomthongdee และคณะ, 2015)

3.5 การปรับสภาพตัวอย่างดินและการแยกแอกติโนมัยสีท

3.5.1 การปรับสภาพตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคความร้อนแห้ง (Dried-heat treatment)

ผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างดินไปบดด้วยโกร่งให้ละเอียดแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Hayakawa และคณะ, 1991) จากนั้นทำการเจือจางโดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ลงใน 0.01% tween 80 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และดูดสารละลายตัวอย่างดิน 1 มิลลิลิตร เจือจางต่อใน 0.01% Basic lauryl sulfate ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-3} ดูดสารละลายตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไป spread ลงบนอาหาร Zhang's starch soil extract (ZSSE) และ Starch casein nitrate (SCN) (ภาคผนวก ก) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 0.1 M HCl ให้มีค่าเท่ากับ 5.5 โดยในอาหารมีการเติม Nystatin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Nalidixic acid ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

3.5.2 การปรับสภาพตัวอย่างดินโดยเทคนิคความร้อนเปียก (Wet-heat treatment)

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ลงใน 0.01% Tween 80 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที (Terahara และคณะ, 2013) จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างดิน 1 มิลลิลิตร ไปเจือจางต่อใน 0.01% Basic lauryl sulfate ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-3} ดูดสารละลายตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไป spread ลงบนอาหาร ZSSE และ SCN ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 0.1 M HCl ให้มีค่าเท่ากับ 5.5 โดยในอาหารมีการเติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

3.6 การคัดเลือกแอกติโนมัยสีทและการทำให้บริสุทธิ์

เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่ม นำ microneedle เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คาดว่าจะจะเป็นแอกติโนมัยสีท เช่น ลักษณะทึบแสง ผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์หรือย่นคล้ายกำมะหยี่ไม่มันวาว เส้นใยอัดกันแน่น เป็นต้น มาขีดลงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) ที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเลือก แอกติโนมัยสีทที่น่าสนใจไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการ cross streak บนอาหาร yeast extract-malt extract agar ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 เพื่อให้ได้โคโลนีเดียวที่บริสุทธิ์และเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วลงอาหารเลี้ยง yeast extract-malt extract agar ที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 เพื่อเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป (Poomthongdee และคณะ, 2015)

3.7 การเก็บรักษาแอกติโนมัยสีท

ทำการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทบริสุทธิ์ (pure culture) บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน หรือจนกระทั่งแอกติโนมัยสีทสร้างสปอร์ ทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของแอกติโนมัยสีทเจริญอยู่เก็บลงในกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสและทำการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อทุกปี

3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.8.1 การคัดเลือกไอโซเลตแอคติโนไมซีที่มียูบิกิตีลินการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น ด้วยวิธี Agar cross streak

นำแอคติโนไมซีมาขีดเป็นเส้นตรงบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน นำจุลินทรีย์ก่อโรคมารีดในแนวตั้งฉากกับแอคติโนไมซีโดยขีดให้ชิดกับขอบโคโลนีแอคติโนไมซี นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, Vancomycin-Resistant *Enterococcus* (VRE) ATCC 15555, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Enterococcus faecium* ATCC 51559, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 สังเกตการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ตรวจวัดระยะด้วย Vernier caliper (Balouiri และคณะ, 2016) และเลือกไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไปศึกษาต่อในขั้นต่อไป

3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

นำแอคติโนไมซีที่ถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำหมักแอคติโนไมซีมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำหมักส่วนใส (supernatant) มาผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อทำการแยกน้ำหมักออกจากตัวเซลล์ แล้วนำน้ำหมักส่วนใส (supernatant) ไปทดสอบฤทธิ์ โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ใช้ Cork borer เจาะรูอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) และ Sabouraud dextrose agar (SDA) (ภาคผนวก ก) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรคตามลำดับ นำจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 9 ชนิด ที่กล่าวไปในข้อ 3.8.1 มาผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและทำการปรับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ก่อโรคให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland 0.5 จากนั้นนำสารละลายจุลินทรีย์ก่อโรค swab ลงบนผิวหน้าอาหารที่เจาะรูเอาไว้ รอให้แห้ง หยดน้ำหมักส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม โดยมีหลุม control ที่ไม่ต้องหยดน้ำหมักลงไป นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำหมักแอคติโนไมซีโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นด้วย Vernier caliper (Balouiri และคณะ, 2016)

3.8.3 การทดสอบความสามารถในการต้านราก่อโรคในพืชด้วยวิธี Dual culture (Poomthongdee และคณะ, 2015)

นำแอคติโนไมซีมาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน และนำรา *Fusarium* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่มของแต่ละเชื้อ นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ทำการเจาะชิ้นส่วนวัชบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปวางบนอาหาร PDA ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 โดยวางราก่อโรคตรงกลางและวางแอคติโนไมซีทั้งสองข้างโดยให้ห่างจากรากตรงกลางอาหาร 3 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งราในเพลทควบคุมเจริญจนถึงขอบเพลท โดยเพลทควบคุมไม่มีแอคติโนไมซีวางอยู่ในเพลท ตรวจผลความสามารถไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการคำนวณของแอกติโนไมซีทโดยการวัดรัศมีการเจริญของราด้วยกับ Vernier caliper และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Percentage Inhibition of Radial Growth) ใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(r_1 - r_2) \times 100}{r_1}$$

เมื่อ r_1 คือรัศมีการเจริญของรากล่อโรในจานอาหารควบคุม (Control plate)

r_2 คือรัศมีการเจริญของรากล่อโรในอาหารที่มีแอกติโนไมซีทวางอยู่

หมายเหตุ: โดยมีการประเมินระดับการยับยั้งดังนี้ - คือไม่มีการยับยั้ง, + คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 30, ++ คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 50, +++ คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 70, ++++ คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 90

3.9 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของแอกติโนไมซีท

3.9.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

3.9.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญของแอกติโนไมซีท

ทำการเลี้ยงแอกติโนไมซีทบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยายเลนส์ 40 เท่า และตรวจสอบการเจริญโดยสังเกตสีของเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีของเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) และสีของรงควัตถุละลายน้ำได้ (Diffusible pigment) เปรียบเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

3.9.1.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

นำแอกติโนไมซีทมาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 4.5 และ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิห้องและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในวันที่ 3, 7 และ 14 (Poomthongdee และคณะ, 2015) เพื่อดูความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ไอโซเลตที่เจริญได้ดีหรือเจริญได้บนอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 เท่านั้น จะพิจารณาว่าชอบความเป็นกรด (acidophiles) และไอโซเลตที่เจริญได้ดีหรือเจริญได้บนอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เท่านั้น จะพิจารณาว่าชอบความเป็นกลาง (neutrophiles) (Khan และ Williams, 1975)

3.9.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

3.9.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการทำให้บริสุทธิ์

นำแอกติโนไมซีทที่ถูกคัดเลือก 14 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 วัน ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ไม้ม้วนพันปราศจากเชื้อเซียโคโลนีแอกติโนไมซีทลงใน TE buffer บดให้ละเอียดจนเซลล์แตก จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ผสมลงใน master mix ของบริษัท Bioneer ที่มีไพรเมอร์และน้ำกลั่นผสมอยู่ ซึ่งใช้ความเข้มข้นและปริมาตรตามตารางที่ 3.1 มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยการนำหลอด master mix ที่มีดีเอ็นเอแม่แบบผสมอยู่ใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ที่มีสภาวะดังตารางที่ 3.2 และไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ด้วยวิธี Gel electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอให้ตรงกับ DNA Marker ขนาด 1,500 bp

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 9F	10.0 pmol/ μ l	5.0 μ l
Primer : 1541R	10.0 pmol/ μ l	5.0 μ l
Master mix	2.0 mM	25.0 μ l
Water	-	13.0 μ l
Template DNA	100 - 200 ng/ μ l	2.0 μ l
รวม		50 μ l

ตารางที่ 3.2 สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Pre-denaturation
95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35	Denaturation
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที		Annealing
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		Extension
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1	Final extension
4 องศาเซลเซียส	∞	-	Cool down
รวมเวลาทั้งสิ้น : 1 ชั่วโมง 57 นาที			

ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) บริสุทธิ์โดยการใช้ DNA Purification Kit ของบริษัท Bioneer ขั้นแรกใส่ Buffer 1 ปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของผลผลิตพีซีอาร์ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่อยู่ใน collection tube ทั้ง ใส่ Buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 1 นาที เทส่วนที่อยู่ใน collection tube ทั้ง (2 ครั้ง) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเดิมอีกครั้งเพื่อกำจัดสิ่งตกค้าง จากนั้นย้าย column ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม DNA elution ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเดิม (2 ครั้ง) เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอดทดลองไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ให้มีอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) อยู่ในช่วง 1.6-1.8 และนำส่งทำ sequence ที่ 1st base laboratory ประเทศมาเลเซีย

3.9.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatics)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อที่ถูกคัดเลือกมา BLAST ในฐานข้อมูล EzBioCloud เพื่อเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ที่มีใกล้เคียงมากที่สุดหรือมีความแตกต่าง เพื่อนำไปจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alignment) ในโปรแกรม Bioedit version 7.2.5.0 และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยกับซอฟต์แวร์ MEGA version 7.0 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างและการแยกแอคติโนไมยีสจากดินป่าพรุ

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมยีสจากดินป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสุไหงโกทลก จังหวัดนราธิวาส และป่าพรุลานควาย อำเภอทุ่งยางแดง จังหวัดปัตตานี ตัวอย่างดินจากป่าพรุทั้ง 2 แหล่งมีความเป็นกรดและเป็นกลางเล็กน้อย โดยป่าพรุโต๊ะแดงมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.22-6.39 และป่าพรุลานควายมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.66-5.37 ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนไมยีสได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลต โดย 20 ไอโซเลต แยกได้จากป่าพรุโต๊ะแดง และ 23 ไอโซเลต แยกได้จากป่าพรุลานควาย ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง ลักษณะดิน อุณหภูมิของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินและไอโซเลตของแอคติโนไมยีสที่คัดแยกได้

สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	รหัส ตัวอย่าง	ลักษณะดิน	อุณหภูมิ ของดิน (°C)	pH ของดิน	ไอโซเลต	รวม
ป่าพรุโต๊ะ แดง	PTD4	ดินร่วน ปนกิ่งไม้	27	4.22	PTD4-11, PTD4-13, PTD4-16, PTD4-29	4
	PTD5	ดินร่วน ปนดินเหนียว	28	4.39	PTD5-6, PTD5-9	2
	PTD6	ดินร่วน ปนหิน	27	4.86	PTD6-13, PTD6-31	2
	PTD7	ดินเปียก สีดำ	25	4.91	PTD7-11	1
	PTD8	ดินและ สึ้น้ำตาลอ่อน ปนกิ่งไม้	26	6.39	PTD8-4, PTD8-8, PTD8-9, PTD8-10, PTD8-21, PTD8-35, PTD8-37, PTD8-41	8
	PTD9	ดินและสีดำ ปนเศษไม้	26	5.30	PTD9-3, PTD9-4, PTD9-10	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง ลักษณะดิน อุณหภูมิของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินและไอโซเลตของแอคติโนมัยซีที่คัดแยกได้ (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะดิน	อุณหภูมิของดิน (°C)	pH ของดิน	ไอโซเลต	รวม
ป่าพรุลานควาย	PLK1	ดินร่วนสีดำปนทรายและรากไม้	27	5.05	PLK1-1, PLK1-5, PLK1-6, PLK1-7, PLK1-8, PLK1-12, PLK1-45	7
	PLK3	ดินเปียกสีน้ำตาลกลาง	25	5.37	PLK3-27, PLK3-28, PLK3-29, PLK3-34, PLK3-71, PLK3-94, PLK3-115	7
	PLK4	ดินเปียกสีน้ำตาลเข้ม	25	4.66	PLK4-13	1
	PLK5	ดินและสีดำ	26	5.36	PLK5-43	1
	PLK6	ดินปนทรายสีดำอมน้ำตาล	28	4.90	PLK6-34, PLK6-38, PLK6-39, PLK6-44, PLK6-54, PLK6-60, PLK6-77	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือกและจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีท

4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากดินป่าพรุทั้งหมด 43 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.5 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลังจากเลี้ยงบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยการตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตจะสังเกตสีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ สีรงควัตถุละลายน้ำที่แอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น และสังเกตลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามสีของเส้นใยอากาศได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทา

แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PTD4-11 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและหนูนอก ขอบหยักเล็กน้อย มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมากและเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (Pale Yellow) มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลือง (Moderate Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงเปิด (open loop)



รูปที่ 4.1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD4-11 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PTD5-6 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร พื้นผิวแข็ง และขรุขระ ขอบหยักเล็กน้อย มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Medium Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (Pale Yellow) ไม่มีการสร้างรังควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.2 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD5-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PTD5-9 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมา และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกเข้ม (Dark Olive) มีการสร้างรังควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเขียวมะกอกอ่อน (Light Olive) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.3 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD5-9 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD6-13 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลือง (Moderate Yellow) สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมเขียว (Brilliant Greenish Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงเปิด (open loop)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.4 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD6-13 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD9-10 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนูน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใย อากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลือง (Brilliant Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียว ปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD9-10 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

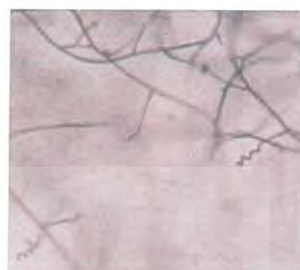
แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK1-5 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและนูน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทาสว่าง (Light Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองปานกลาง (Moderate Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.6 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-5 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

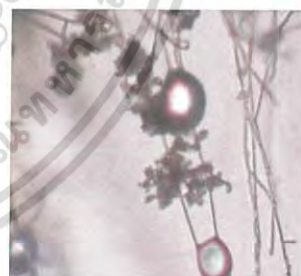
แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-71 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนูน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้ม (Dark Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมส้ม (Brilliant Orange Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

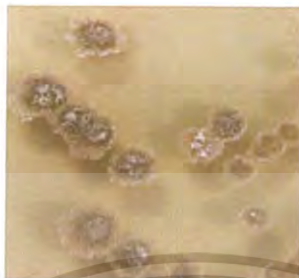
รูปที่ 4.7 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK3-71 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล(long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

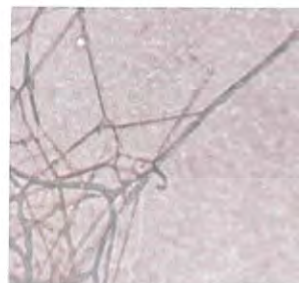
แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK6-34 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนและมีย่อยพับทบกันไปมา ขอบหยัก มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาสว่าง (Light Gray) และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกกลาง (Moderate Olive) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงปลายเปิด (open loop)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.8 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK6-34 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

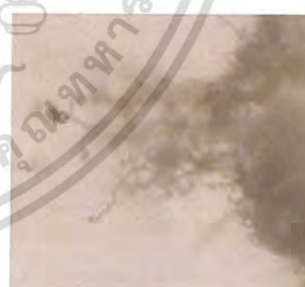
แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK6-38 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนนอกและแข็งขอบหยัก รอบโคโลนีมีฝุ่นคล้ายผงแป้งเกิดขึ้น มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาสว่าง (Light Gray) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง (Strong Yellowish Brown) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.9 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK6-38 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

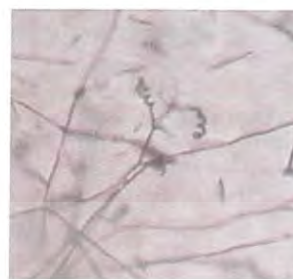
แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK6-39 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนุ่มและแข็ง ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาสว่าง (Light Gray) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอกอ่อน (Light Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.10 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK6-39 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK6-44 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Medium Gray) และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมส้ม (Moderate Orange Yellow) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงปลายเปิด (open loop)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.11 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK6-44 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

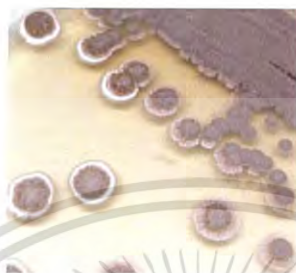
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลอมเทา

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD4-29 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลเนียตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาลอ่อน (Light Brownish Gray) และเส้นใยอาหารมีสีน้ำตาลอ่อนออกเหลือง (Light Yellowish Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงเปิด (open loop)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.12 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD4-29 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD6-31 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลเนียตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาลแดง (Light Grayish Reddish Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมแดง (Moderate Reddish Brown) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีส้ม (Moderate Orange) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.13 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD6-31 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD7-11 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาลอ่อน (Light Brownish Gray) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อนออกเหลือง (Light Yellowish Brown) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีส้มเข้มสีเหลือง (Dark Orange Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.14 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD7-11 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD8-10 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็ง นูน ขอบเรียบ เส้นใยอากาศมีสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทาอมน้ำตาลอ่อน (Light Brownish Gray) ในช่วงที่ เส้นใยมีอายุมาก และมีการสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอ่อน (Pale Greenish Yellow) ไม่มีการ สร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.15 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-10 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

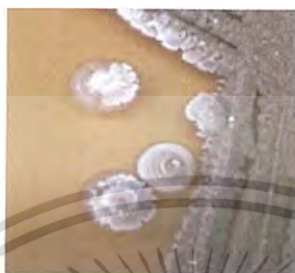
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา

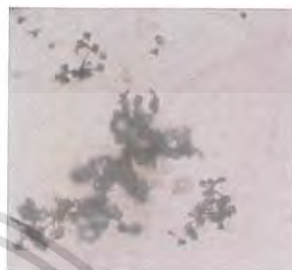
แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD4-13 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย และแข็ง ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกอมเทา (Grayish Olive Green) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวเทา (Grayish Greenish Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD4-13 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

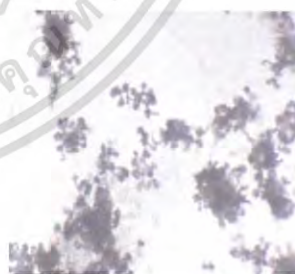
แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD4-16 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและนูนขึ้น ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกเข้ม (Dark Olive Green) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารมีสีขาวอมเขียว (Greenish White) ไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลาย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่อัดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.17 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD4-16 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PTD8-4 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและหนูน ขอบมีลักษณะหยักเล็กน้อย มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา (Grayish Green) และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกอมเทา (Grayish Olive Green) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเขียวมะกอกอ่อน (Light Olive) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.18 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-4 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PTD9-4 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีหนูนและแข็ง ขอบโคโลนี หยัก มีเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทา (Grayish Green) และเส้นใยอาหารสีมะกอกปานกลาง (Moderate Olive) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองเข้ม (Dark Yellow) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะ เกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

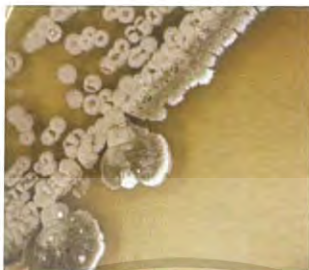
รูปที่ 4.19 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD9-4 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK1-1 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อยและแข็ง มีเส้นใยอากาศสีเขียวแกมเหลืองอมเทา (Grayish Yellowish Green) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Light Olive Brown) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเขียวมะกอกอ่อน (Light Olive) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.20 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-1 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK1-7 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนูนและแข็ง ขอบโคโลนี หัก มีเส้นใยอากาศสีเขียวมะกอกอมเทา (Grayish Olive Green) และเส้นใยอาหารสีมะกอกปานกลาง (Moderate Olive) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.21 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-7 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

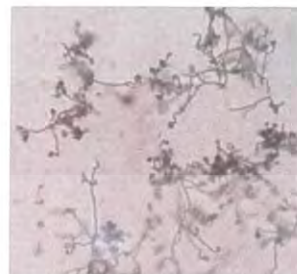
แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK1-12 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อยและแข็ง ขอบหยัก มีเส้นใยอากาศสีเขียวอมเทาเข้ม (Dark Greenish Gray) และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกปานกลาง (Moderate Olive Green) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.22 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-12 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาล

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD8-35 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ พื้นผิวแข็งและขรุขระ มีเส้นใยอากาศสีน้ำตาล (Moderate Brown) และเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Greenish White) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียววงเปิด (open spirals)



รูปที่ 4.23 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-35 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PLK6-54 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ผิวมี รอยหย่น ขรุขระ มีเส้นใยอากาศสีน้ำตาล (Strong Brown) และเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Greenish White) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow) สร้างสปอร์ที่มี ลักษณะเป็นเส้นสายปลายโค้งงอรวมกันเป็นกระจุก



รูปที่ 4.24 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-35 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 แอคติโนมัยสีที่สร้างเส้นใยอากาศสีดำ

แอกติโนมัยสีที่ไอโซเลต PTD8-8 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาล จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ (Brownish Black) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวปานกลาง (Moderate Greenish Yellow) มีการสร้างรังควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีมะกอกอมน้ำตาลปานกลาง (Moderate Olive Brown) สร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ชิดกันแน่น (closed spirals)



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.25 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-8 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 แอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PLK1-8 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีหนูนและแข็ง ผิวขรุขระ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู (Pale Yellowish Pink) และเส้นใยอาหารสีส้ม (Moderate Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเส้นสายหยักและโค้งงอ



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.26 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-8 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

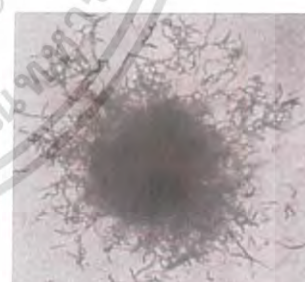
แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PLK1-45 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีหนูนและแข็ง ขนาดเล็ก มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู (Pale Yellowish Pink) และเส้นใยอาหารสีส้ม (Moderate Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเส้นสายหยักและโค้งงอ



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.27 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-45 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 แอคติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศและสร้างสปอร์สีดำ

แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD8-9 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Moderate Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.28 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-9 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PTD8-21 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.29 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-21 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD8-37 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.30 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-37 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PTD8-41 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)

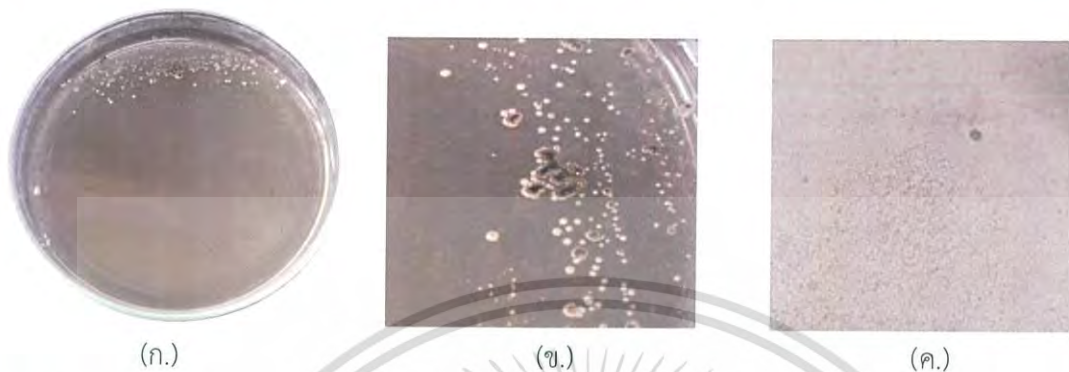


(ค.)

รูปที่ 4.31 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD8-37 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-29 เจริญได้ไม่ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีเหลืองอมขาว (Pale Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



รูปที่ 4.32 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK3-29 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-34 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและขนาดเล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นรอยพับบนขึ้น มีเส้นใยอาหารสีส้มสดใส (Vivid Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



รูปที่ 4.33 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK3-34 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

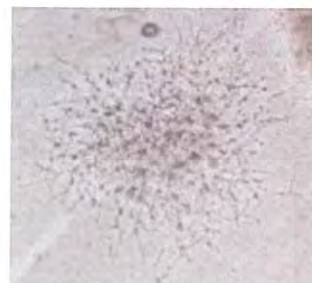
เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-94 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.34 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK3-94 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

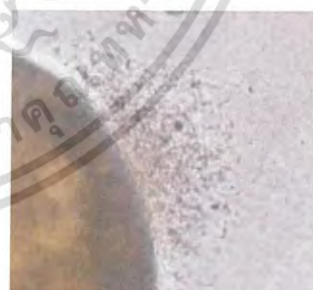
แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-115 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

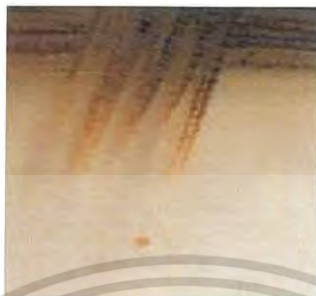
รูปที่ 4.35 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK3-115 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

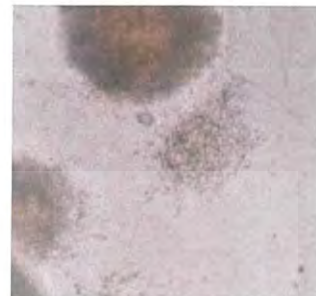
เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK4-13 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือก มันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.36 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK4-13 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

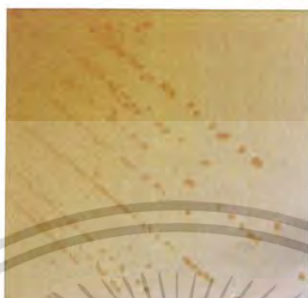
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 แอคติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศและสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้ม

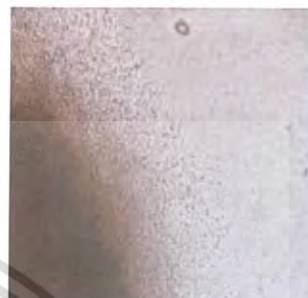
แอกติโนมัยสีทไอโซเลต PLK6-60 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็ก และนูน ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์สีน้ำตาลอมเหลือง (Strong Yellowish Brown) ขึ้นคลุม เส้นใยอาหารที่มีสีเหลืองอมส้ม (Strong Orange Yellow) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง เชื้อสีเหลืองอมเขียว (Vivid Greenish Yellow) สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร



(ก.)



(ข.)



(ค.)

รูปที่ 4.37 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK6-60 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยอาหารและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ ส่องระยะไกล (long working distance) ที่กำลังขยาย 40X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 แอคติโนมัยสีทที่ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน

แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PTD9-3 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กและนุ่ม รูปร่างคล้ายถ้วย ขอบหยัก ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลืองสดใส (Deep Yellowish Pink) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.38 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PTD9-3 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PLK1-6 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนุ่มและแข็ง ขอบเรียบ ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมส้มอ่อน (Pale Orange Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.39 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-27 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้น เล็กน้อยและนุ่ม ขอบเรียบ ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมส้มอ่อน (Pale Orange Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.40 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-28 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีสูงและแข็ง ขอบเรียบ ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีเหลือง (Brilliant Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.41 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK5-43 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนุ่มและนิ่ม มีรอยพับทบไปมา ผิวขรุขระ ขอบหยัก ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลืองสดใส (Vivid Yellowish Pink) เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะมีสีซีดลง ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



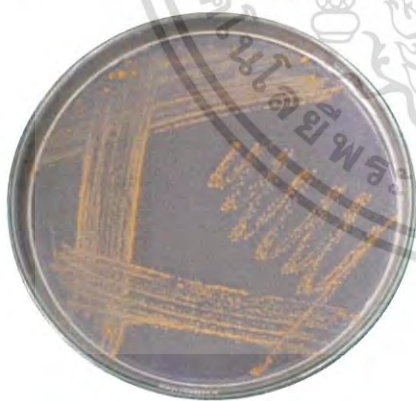
(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.42 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

แอกติโนมัยซีทไอโซเลต PLK6-77 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีเล็กและแข็ง ขอบเรียบ ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีส้ม (Strong Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ



(ก.)



(ข.)

รูปที่ 4.43 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PLK1-6 บนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7-14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ

นำแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากดินป่าพรุทั้งหมด 43 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract – malt extract agar (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.5 และ 7.5 เพื่อศึกษาการเจริญ หลังจากเลี้ยงบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3, 5 และ 14 วัน โดยการสังเกตและเปรียบเทียบการเจริญเติบโต พบว่าสามารถจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามกลุ่มของกรด-ด่างที่ใช้ในการเจริญได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มชอบความเป็นกลาง (Neutrophile) ที่สามารถเจริญได้ในช่วง pH 5.5-8.5, กลุ่มชอบความเป็นกลางและสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด (Acidotolerant neutrophile) เจริญได้ในช่วง pH 5.0-9.0 และกลุ่มที่ชอบความเป็นกรดและทนความเป็นกลาง (Neutrotolerant acidophile) สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.5-7.5 ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ

ไอโซเลต	กลุ่มของกรด-เบส	ช่วง pH การเจริญ
PTD4-11	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD4-13	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD4-16	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD4-29	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD5-6	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD5-9	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD6-13	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD6-31	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD7-11	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD8-4	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD8-8	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD8-9	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD8-10	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD8-21	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD8-35	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD8-37	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD8-41	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0
PTD9-3	Neutrophiles	5.5-8.5
PTD9-4	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PTD9-10	Acidotolerant neutrophiles	5.0-9.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะในวงวิชาการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่มของกรด-เบส	ช่วง pH การเจริญ
PLK1-1	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK1-5	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK1-6	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK1-7	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK1-8	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK1-12	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK1-45	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK3-27	Neutrophiles	5.5-8.5
PLK3-28	Neutrophiles	5.5-8.5
PLK3-29	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK3-34	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK3-71	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK3-94	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK3-115	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK4-13	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK5-43	Neutrophiles	5.5-8.5
PLK6-34	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK6-38	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK6-39	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK6-44	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK6-54	Neutrotolerant acidophiles	4.5-7.5
PLK6-60	Acidotolerent neutrophiles	5.0-9.0
PLK6-77	Neutrophiles	5.5-8.5

แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากป่าพรุ 43 ไอโซเลตเมื่อนำมาจัดกลุ่มตามความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ พบว่าแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในกลุ่ม Neutrotolerant acidophile มี 15 ไอโซเลต แอคติโนมัยสีทที่อยู่ในกลุ่ม Acidotolerent neutrophile มี 24 ไอโซเลต และที่อยู่ในกลุ่ม Neutrophile อีก 4 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษานี้พบแอกติโนมัยสีทกลุ่ม Acidotolerant neutrophile มากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Ding และคณะ (2009) ที่ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินที่มีความเป็นกรดได้ทั้งหมด 369 ไอโซเลต ซึ่ง 6.6% เป็น Strictly acidophiles, 72% เป็น Neutrotolerant acidophiles และ 21% เป็น Acidotolerant neutrophiles เห็นได้ว่าพบแอกติโนมัยสีทกลุ่ม Neutrotolerant acidophiles มากที่สุด แตกต่างกับการศึกษานี้ที่พบแอกติโนมัยสีทกลุ่ม Acidotolerant neutrophiles มากกว่า Neutrotolerant acidophile อาจเป็นเพราะว่าช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกแอกติโนมัยสีทนั้นเป็นช่วงฤดูฝนของทางภาคใต้ ปริมาณน้ำฝนที่เข้าสู่ป่าพรุมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ดินมีความเป็นกรดลดลง จึงทำให้พบแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ชอบความเป็นกลางและทนกรด (acidotolerant neutrophile) ได้มากกว่ากลุ่มที่ชอบความเป็นกรด (acidophile) และอาจเป็นเพราะในขั้นตอนการแยกแอกติโนมัยสีท อาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 5.5 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างนี้ แอกติโนมัยสีทที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ กลุ่ม Neutrotolerant acidophile ที่สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 4.5-7.5 เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.5 และกลุ่ม Acidotolerant neutrophile ที่เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.0-9.0 ในขณะที่กลุ่ม Strictly acidophiles สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.5-6.5 และเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (Khan และ Williams, 1975) ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการแยกเชื้อไม่เหมาะสมกับการเจริญของแอกติโนมัยสีทกลุ่ม Strictly acidophiles จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้น้อยกว่ากลุ่ม Acidotolerant neutrophile และ Neutrotolerant acidophile

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.3.1 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobial activity)

การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี Agar cross streak พบว่าจากทั้งหมด 43 ไอโซเลต มี 16 ไอโซเลต (37.2%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จึงได้เลือกทั้ง 16 ไอโซเลตนี้ไปทดสอบฤทธิ์ต่อด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าจาก 16 ไอโซเลต มี 5 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ PTD4-29, PTD6-31, PTD9-10, PLK1-5 และ PLK3-71 จากตาราง 4.3 แสดงให้เห็นว่า มี 3 ไอโซเลต (6.9%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis*, มี 2 ไอโซเลต (4.65%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ VRE, มี 3 ไอโซเลต (6.9%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, มี 5 ไอโซเลต (11.63%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. luteus*, มี 3 ไอโซเลต (6.9%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Ent. faecium*, มี 4 ไอโซเลต (9.3%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA และมี 2 ไอโซเลต (4.65%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* และทั้ง 5 ไอโซเลตนี้ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้

จากการทดลองนี้เห็นได้ว่าแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัยสิทธิ์ นิยะสม และคณะ (2015) ที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobial activity) ของแอคติโนมัยสีทที่ชอบความเป็นกรด (acidophilic actinomycetes) ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรด โดยนำแอคติโนมัยสีทที่ชอบความเป็นกรดมาทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* พบว่าจากทั้งหมด 32 ไอโซเลต มี 15 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ซึ่งไอโซเลตส่วนมากมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silambarasan และคณะ (2012) ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน นำแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มาทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *Klebsiella* sp., *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้วิธี Agar well diffusion พบว่าจากทั้งหมด 27 ไอโซเลต มี 11 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งมี 7 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *B. subtilis*, มี 3 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *Klebsiella* sp., มี 6 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *B. cereus*, มี 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และมีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นั้นเป็นเพราะความแตกต่างของความไว (sensitivity) ระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน แบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ที่มี lipopolysaccharide เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความจำเพาะกับสารที่จะผ่านเข้าไปยังเซลล์มากกว่า ทำให้สารที่แอคติโนมัยสีทผลิตออกมาเข้าไปทำลาย peptidoglycan หรือผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีท ด้วยวิธี Agar well diffusion

ไอโซเลต	ระยะการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (มิลลิเมตร)								
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	VRE	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Ent. faecium</i>	MRSA	<i>C. albicans</i>
PTD 4-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 4-29	-	-	-	-	-	7.82	-	-	14.01
PTD 5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 5-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 6-31	14.55	-	-	11.92	-	13.57	-	13.04	-
PTD 7-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 8-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 8-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 8-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTD 9-10	14.14	-	18.11	16.71	-	24.36	19.8	14.20	-
PLK 1-5	-	-	12.09	-	-	13.23	13.64	8.35	-
PLK 3-71	25.3	-	-	20.54	-	12.37	12.14	10.9	14.55
PLK 6-34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLK 6-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLK 6-44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLK 6-60	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, no clear zone

4.3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านราก่อโรคในพืช (antifungal activity)

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชด้วยวิธี Dual culture ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด พบว่ามี 8 ไอโซเลต (คิดเป็น 18.6% จากเชื้อทั้งหมด) ที่มีความสามารถต่อต้านการเจริญของราก่อโรคในพืช *Fusarium* sp. ได้ จาก 8 ไอโซเลตนี้ มี 4 ไอโซเลต ถูกจัดให้เป็นแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกรด (Acidophiles) และอีก 4 ไอโซเลตที่ชอบความเป็นกลาง (Neutrophiles) ดังตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่ามี 2 ไอโซเลต ที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรามากกว่า 70% ได้แก่ PTD5-9 และ PTD8-8 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71.03% และ 76.11% ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองไอโซเลตนี้เป็นแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกรด และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแอคติโนมัยสียทั้งสองกลุ่ม พบว่าแอคติโนมัยสียกลุ่มที่ชอบความเป็นกรดสามารถต่อต้านรา *Fusarium* sp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าแอคติโนมัยสียกลุ่มที่ชอบความเป็นกลาง

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นลิน พุ่มทองดี และคณะ (2015) ที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านราของแอคติโนมัยสียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืช โดยใช้วิธี Dual culture ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด บนอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 เช่นเดียวกับการทดลองนี้ พบว่าจากทั้งหมด 351 ไอโซเลต มี 203 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งรา *Fusarium moniliforme* ได้ ซึ่งไอโซเลตที่ยับยั้งราได้อย่างมีประสิทธิภาพส่วนมากเป็นแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกรด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zakulyakuna และ Zenova (2007) ที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านราก่อโรคในพืชของแอคติโนมัยสียสกุล *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน โดยทำการทดสอบทั้งในสภาวะอาหารเป็นกลาง (pH7) และเป็นกรด (pH5) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านราของ *Streptomyces* ที่ชอบความเป็นกลางกับชอบความเป็นกรดและพบว่า *Streptomyces* ที่ชอบความเป็นกรด สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชบนอาหารที่เป็นกรดได้ดีกว่าบนอาหารที่เป็นกลาง

จึงสรุปได้ว่าแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกรดสามารถต้านการเจริญของราก่อโรคในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เป็นเพราะว่าการประเมินความสามารถในการต้านราได้ทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่เป็นกรด จึงเป็นการสนับสนุนการเจริญของแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกรดให้เจริญได้ดีกว่าแอคติโนมัยสียที่ชอบความเป็นกลาง

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านราของแอคติโนมัยสียด้วยวิธี Dual culture

ไอโซเลต	กลุ่มของกรด-เบส	% การยับยั้ง	ระดับการยับยั้ง
PTD 4-11	Neutrophiles	15.36%	-
PTD 4-13	Neutrophiles	0.02%	-
PTD 4-16	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 4-29	Acidophiles	61.3%	++
PTD 5-6	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 5-9	Acidophiles	71.03%	+++
PTD 6-13	Acidophiles	18.74%	-
PTD 6-31	Acidophiles	0.00%	-
PTD 7-11	Acidophiles	0.00%	-
PTD 8-4	Neutrophiles	0.00%	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับนักศึกษาเพื่อการศึกษาเท่านั้นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านราของแอคติโนไมซีต์ด้วยวิธี Dual culture (ต่อ)

ไอโซเลต	กลุ่มของกรด-เบส	% การยับยั้ง	ระดับการยับยั้ง
PTD 8-8	Acidophiles	76.11%	+++
PTD 8-9	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 8-10	Neutrophiles	46.87%	+
PTD 8-21	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 8-35	Acidophiles	53.3%	++
PTD 8-37	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 8-41	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 9-3	Neutrophiles	0.00%	-
PTD 9-4	Acidophiles	0.00%	-
PTD 9-10	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 1-1	Acidophiles	0.00%	-
PLK 1-5	Neutrophiles	42.78%	+
PLK 1-6	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 1-7	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 1-8	Acidophiles	0.00%	-
PLK 1-12	Neutrophiles	37.99%	+
PLK 1-45	Acidophiles	1.59%	-
PLK 3-27	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 3-28	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 3-29	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 3-34	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 3-71	Acidophiles	16.95%	-
PLK 3-94	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 3-115	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 4-13	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 5-43	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 6-34	Neutrophiles	54.52%	++
PLK 6-38	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 6-39	Acidophiles	0.00%	-
PLK 6-44	Acidophiles	0.00%	-
PLK 6-54	Acidophiles	0.00%	-
PLK 6-60	Neutrophiles	0.00%	-
PLK 6-77	Neutrophiles	0.00%	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยสีที่คัดเลือก

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสกุล (genus) ของแอกติโนมัยสีที่คัดเลือกจำนวน 14 ไอโซเลต จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลต ได้แก่ PTD4-29 PTD5-9 PTD6-31 TTD8-8 PTD8-35 PTD9-3 PTD9-10 PLK1-5 PLK3-71 PLK5-43 PLK6-34 PLK6-54 และ PLK6-60 โดยคัดเลือกไอโซเลตดังกล่าว จากกิจกรรมทางชีวภาพ (biology activity) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) ที่น่าสนใจ เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene พบว่าแอกติโนมัยสีที่คัดเลือกทั้ง 14 ไอโซเลต จัดอยู่ใน 3 วงศ์ (family) ได้แก่ *Micromonosporaceae* *Streptomycetaceae* และ *Streptosporangiaceae* ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 สกุล (genus) ได้แก่ *Micromonospora* (2 ไอโซเลต) *Microbispora* (2 ไอโซเลต) และ *Streptomyces* (10 ไอโซเลต) โดยมีค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ที่ใกล้เคียงมากที่สุดของแอกติโนมัยสีที่คัดเลือกกับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) แสดงในตารางที่ 4.5

ผลจากการแยกแอกติโนมัยสีในการศึกษานี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanasupawat และคณะ (2014) ที่สามารถแยกแอกติโนมัยสีได้หลากหลายสกุลจากป่าพรุและพบว่าแอกติโนมัยสีที่แยกได้ จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* 35 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 3 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 9 ไอโซเลต และยังสามารถแยกแอกติโนมัยสีในสกุลอื่นๆ ได้อีกหลายสกุลนอกเหนือจาก 3 สกุลที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแอกติโนมัยสีที่แยกได้จากป่าพรุในครั้งนี้มีความหลากหลายสูง

เมื่อนำแอกติโนมัยสีจำนวน 14 ไอโซเลตไปพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสกุลแล้วพบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด (10 ไอโซเลต) (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้เนื่องจาก *Streptomyces* จัดว่าเป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดของแอกติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) โดยพบอยู่ประมาณ 500 สปีชีส์จากสกุลนี้ (Hasani และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงสามารถพบแอกติโนมัยสีสกุล *Streptomyces* ได้มากที่สุด

จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสีที่คัดเลือกทั้ง 14 ไอโซเลต พบว่ามี 1 ไอโซเลต คือ PTD9-10 เป็นสปีชีส์ใหม่ (new species) เนื่องจากมี %similarity value เท่ากับ 98.7% ดังที่ Chun และคณะ (2018) ได้รายงาน ว่า หากมีระดับความคล้ายคลึง (% similarity value) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูลที่น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 98.7 จะสามารถระบุได้ว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ และพบว่ามี 6 ไอโซเลต ได้แก่ PTD5-9 PTD6-31 PLK1-5 PLK6-34 PLK6-54 และ PLK6-60 ที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่เนื่องจากมี % similarity value ค่อนข้างต่ำและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูล

ตารางที่ 4.5 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene (% similarity) ของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานะข้อมูล

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	%similarity	ความยาว (bp)
PTD4-29	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T	99.7	1,530
PTD5-9	<i>Streptomyces gelaticus</i> NRRL B-2928 ^T	99.3	1,492
PTD6-31	<i>Streptomyces viridobrunneus</i> LMG 20317 ^T	99.3	1,531
PTD8-8	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T	99.5	1,524
PTD8-35	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T	99.5	1,492
PTD9-3	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 ^T	99.6	1,519
PTD9-10	<i>Streptomyces sasae</i> JR-39 ^T	98.7	1,518
PLK1-5	<i>Streptomyces rubrisoli</i> FXJ1.725 ^T	99.2	1,464
PLK3-29	<i>Micromonospora narathiwatensis</i> DSM 45248 ^T	99.9	1,419
PLK3-71	<i>Streptomyces demainii</i> NRRL B-1478 ^T	99.8	1,535
PLK5-43	<i>Microbispora triticiradicis</i> NEAU-HRDPA2-9 ^T	99.5	1,533
PLK6-34	<i>Streptomyces albospinus</i> NBRC 13846 ^T	99.0	1,530
PLK6-54	<i>Streptomyces rubidus</i> 13C15 ^T	99.0	1,530
PLK6-60	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	98.9	1,404
	<i>Micromonospora slamensis</i> DSM 45097 ^T	98.9	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.1 วงศ์ *Micromonosporaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Micromonospora* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) สกุล *Micromonospora*

แอกติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PLK3-29 เจริญได้ไม่ติดบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ขึ้นคลุมเส้นใยอาหาร ลักษณะเป็นเมือกมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีเส้นใยอาหารสีเหลืองอมขาว (Pale Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 4.44) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK3-29 เป็นเชื้อในสกุล *Micromonospora* (รูปที่ 4.45) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora narathiwatensis* DSM 45248^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.9% (ตารางที่ 4.5) และจากงานวิจัยของ Thawai และคณะ (2007) พบว่า *Micromonospora narathiwatensis* มีการสร้างสีของเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง (yellowish white) ไปจนถึงเหลืองอมเทา (grayish yellow) สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ มีการสร้างสปอร์สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black) ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK3-29 มีส่วนคล้ายคลึงกับ *Micromonospora narathiwatensis*

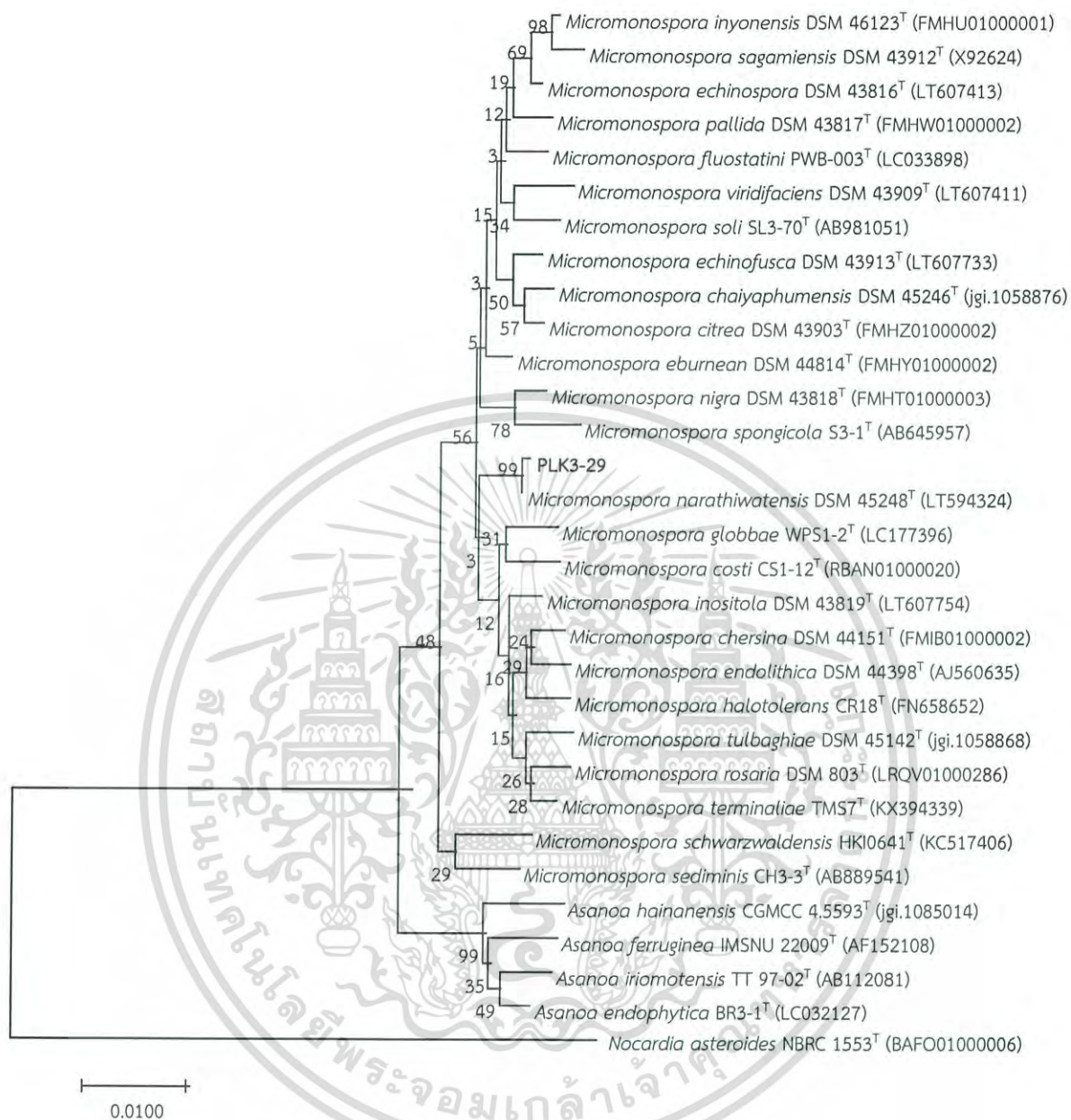


(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.44 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK3-29 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.45 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-29 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK6-60 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กและหนา ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์สีน้ำตาลอมเหลือง (Strong Yellowish Brown) ชั้นคลุมเส้นใยอาหารที่มีสีเหลืองอมส้ม (Strong Orange Yellow) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมเขียว (Vivid Greenish Yellow) สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 4.46) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK6-60 จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* (รูปที่ 4.47) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ 2 สปีชีส์ คือ *Micromonospora siamensis* DSM 45097^T และ *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 98.9% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Thawai และคณะ (2005) พบว่า *Micromonospora siamensis* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (vivid orange) จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ (Brownish Black) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอ่อน (pale Yellow) และจากงานวิจัยของ Sveshnikova และคณะ (1969) ระบุว่า *Micromonospora aurantiaca* มีการสร้างเส้นใยอาหารสีส้มสด (Bright orange) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอ่อน (pale Yellow) ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวทั้ง 2 สปีชีส์ มีความแตกต่างกับไอโซเลต PLK6-60 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Micromonospora siamensis* และ *Micromonospora aurantiaca* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด แต่หากต้องการที่จะระบุชนิดให้แน่นอนจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม อาทิเช่น Whole genome sequencing หรือ chemotaxonomic characterization เป็นต้น

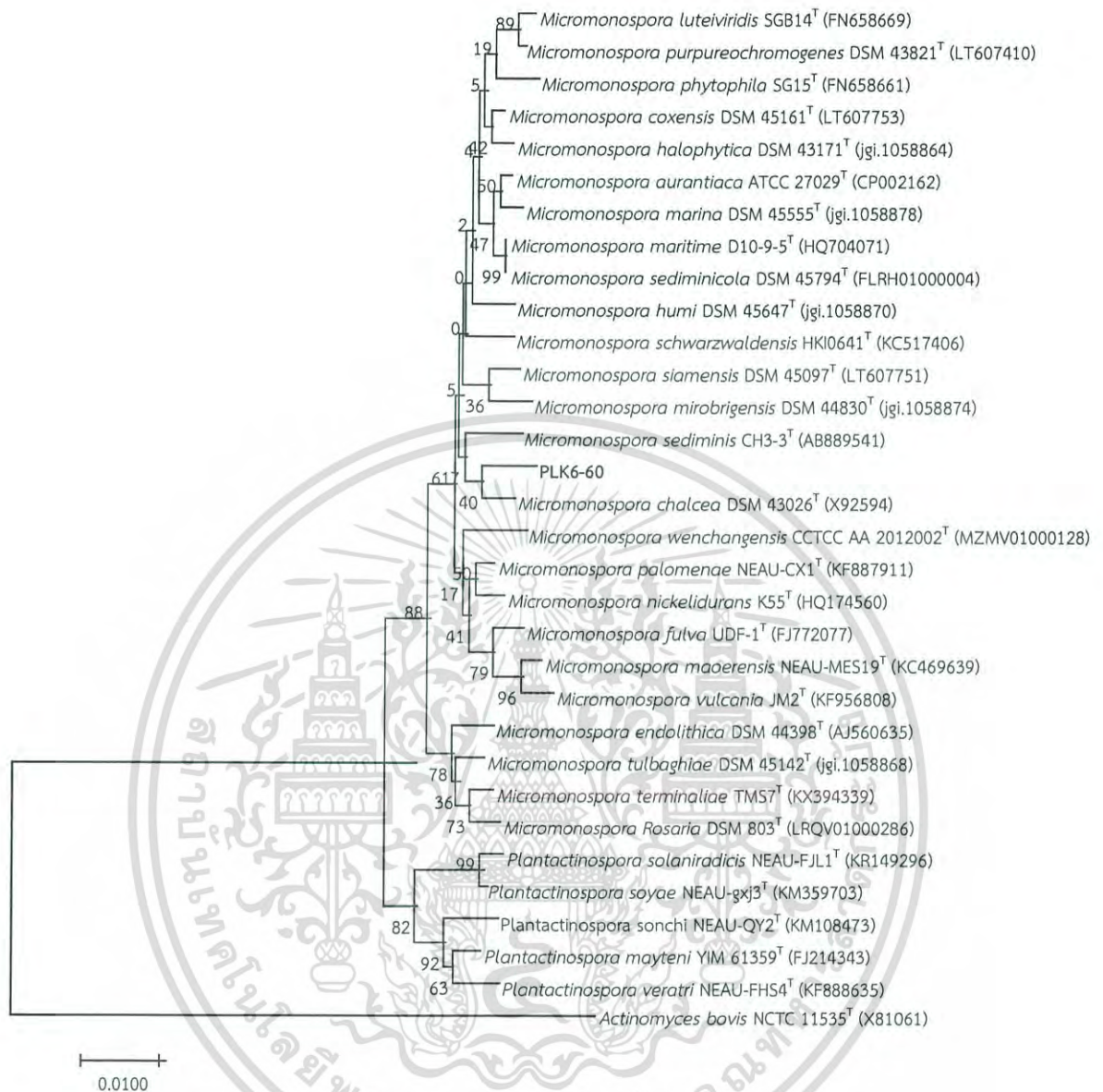


(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.46 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK6-60 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.47 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-60 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 วงศ์ *Streptosporangiaceae*

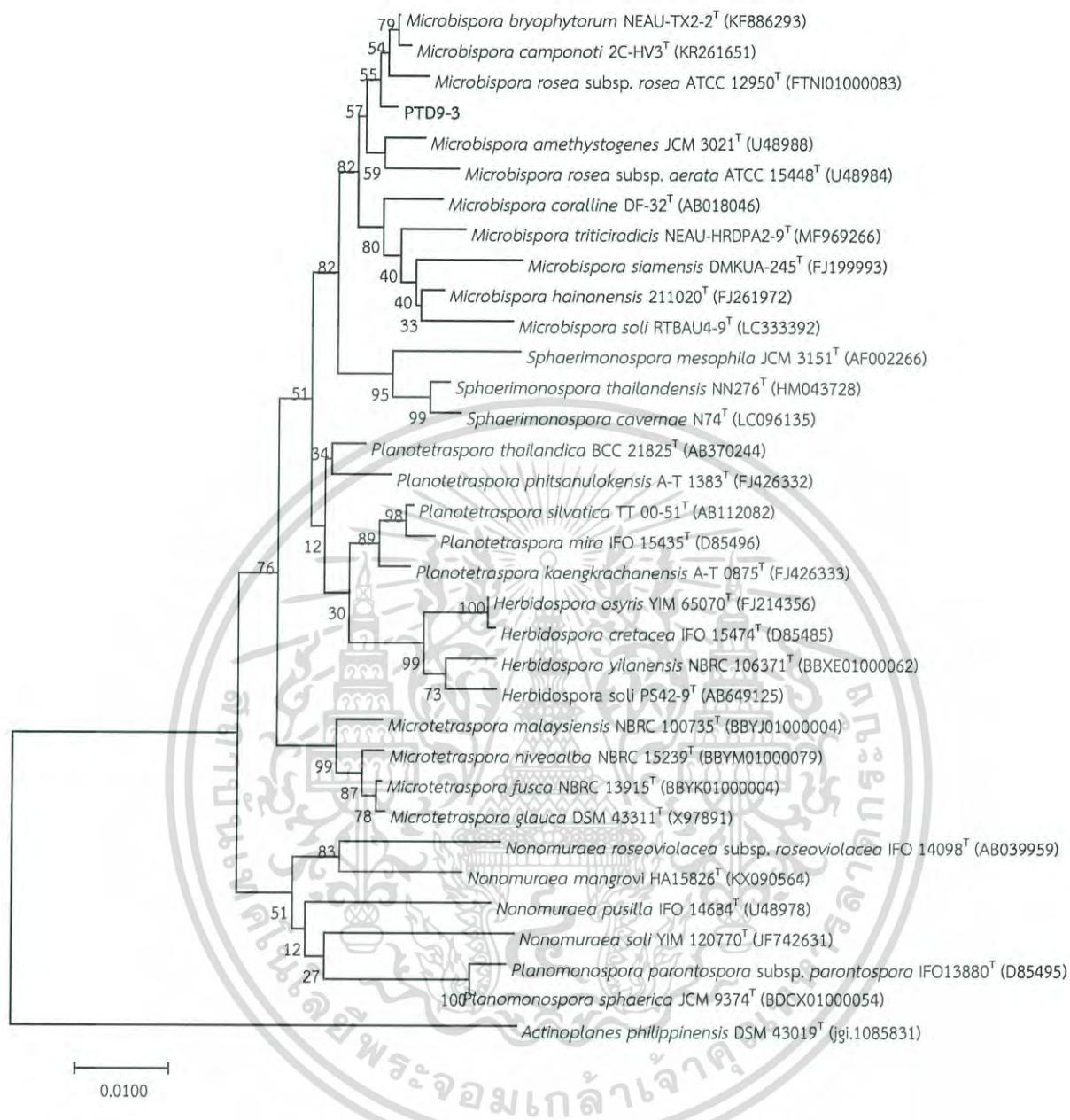
ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Microbispora* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) สกุล *Microbispora*

แอคติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PTD9-3 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็กและนํม รูปร่างคล้ายถ้วย ขอบหยัก ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลืองสดใส (Deep Yellowish Pink) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.48) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD9-3 จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* (รูปที่ 4.49) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.6% จากงานวิจัยของ Li และคณะ (2015) พบว่า *Microbispora bryophytorum* มีการสร้างเส้นใยอาหารตั้งแต่เทาอมชมพู (pinkish grey) ไปจนถึงน้ำตาลแดงเข้ม (dark reddish brown) และไม่พบการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD9-3 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Microbispora* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Microbispora bryophytorum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 4.48 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD9-3 ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.49 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK5-43 เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีนุ่มและนิ่ม มีรอยพับทบไปมา ผิวขรุขระ ขอบหยัก ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน และเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลืองสดใส (Vivid Yellowish Pink) เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะมีสีซีดลง ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.50) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK5-43 เป็นเชื้อในสกุล *Microbispora* (รูปที่ 4.51) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora triticiradicis* NEAU-HRDPA2-9^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.5% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Han และคณะ (2018) มีการสร้างสีของเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง (yellowish white) ไปจนถึงสีน้ำตาล (strong brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD9-3 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Microbispora* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Microbispora triticiradicis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด

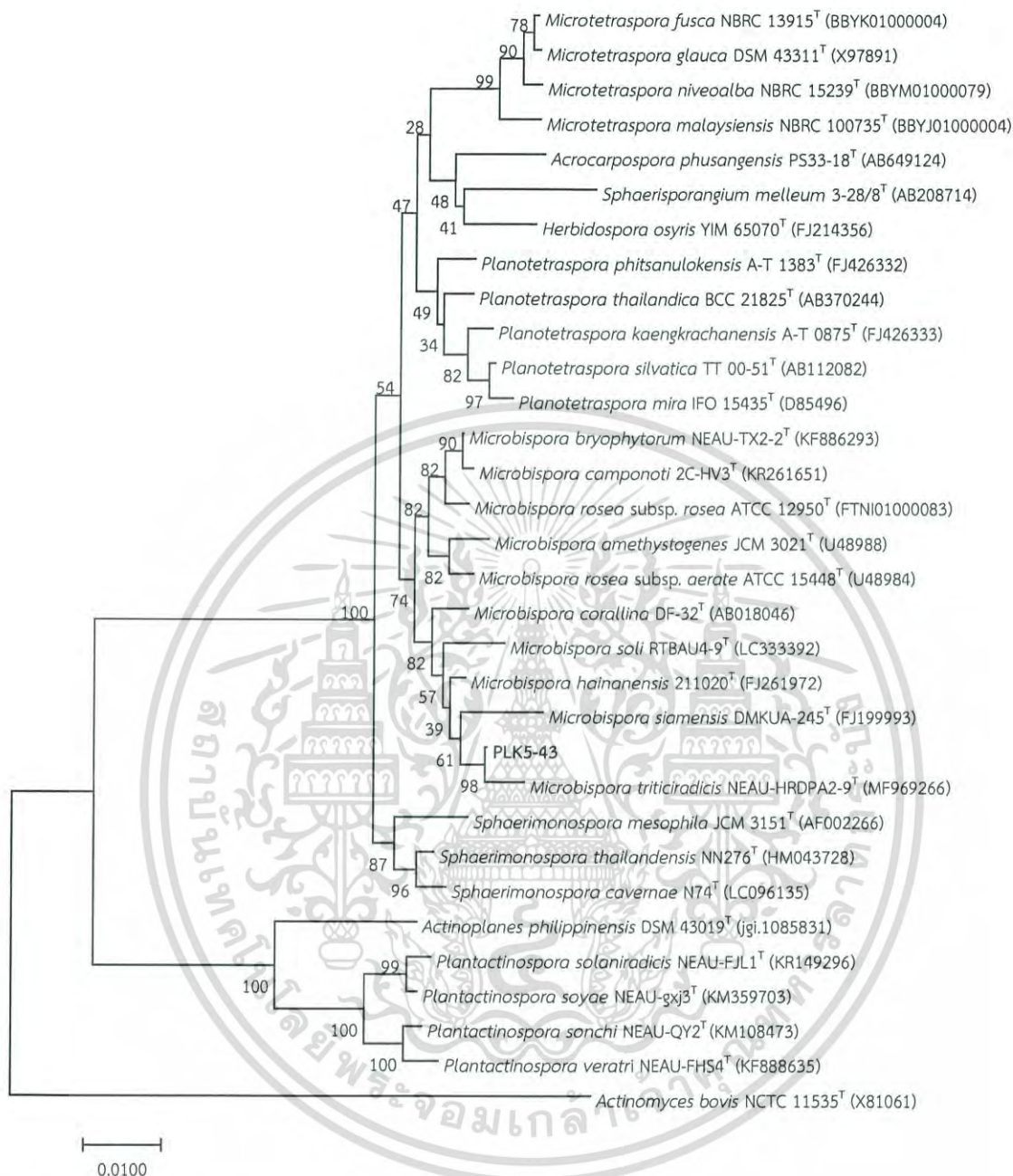


(ก)

(ข)

รูปที่ 4.50 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK5-43 ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.51 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK5-43 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 วงศ์ *Streptomycetaceae*

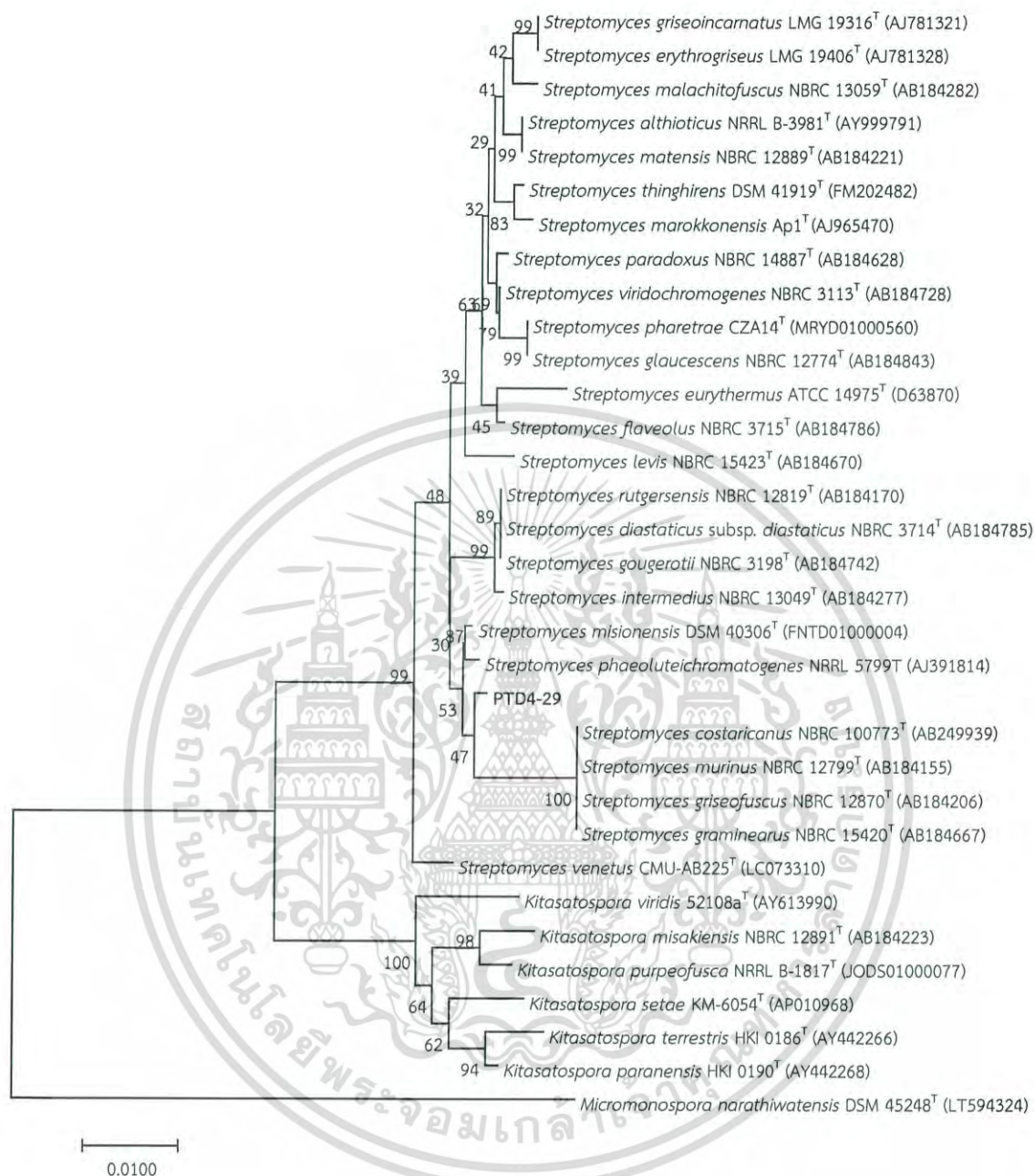
ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Streptomyces* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) สกุล *Streptomyces*

แอคติโนมัยสีทจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PTD4-29 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาลอ่อน (Light Brownish Gray) และเส้นใยอาหารมีสีน้ำตาลอ่อนออกเหลือง (Light Yellowish Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงเปิด (open loop) (รูปที่ 4.52) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD4-29 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.53) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.7% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Cercos และคณะ (1962) พบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเหลือง (yellowish white) สร้างเส้นใยอาหารสีเทาอมเหลือง (yellowish gray) ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD4-29 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces misionensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.52 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD4-29 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



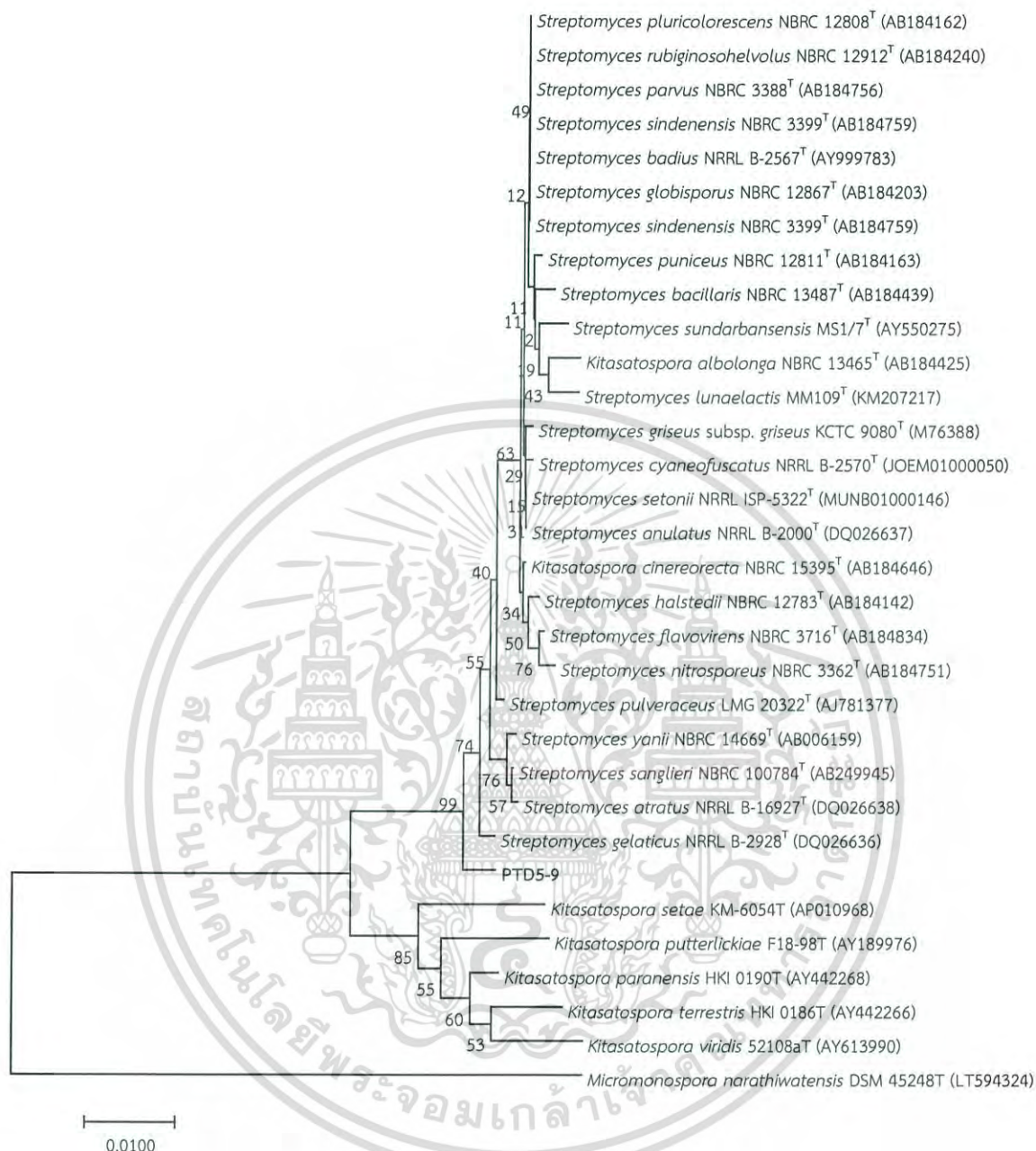
รูปที่ 4.53 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD4-29 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PTD5-9 แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PTD5-9 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกเข้ม (Dark Olive) มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเขียวมะกอกอ่อน (Light Olive) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals) (รูปที่ 4.54) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD5-9 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.55) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.3% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Waksman (1923) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา(gray) สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง (yellowish brown) ไปจนถึงเขียว (green) และไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD5-9 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces gelaticus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.54 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD5-9 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.55 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD5-9 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PTD6-31 แอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต PTD6-31 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาลแดง (Light Grayish Reddish Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมแดง (Moderate Reddish Brown) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหาร เลี้ยงเชื้อสีส้ม (Moderate Orange) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals) (รูปที่ 4.56) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD6-31 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.57) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces viridobrunneus* LMG 20317^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.3% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Krasil'nikov (1970) พบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (gray) และสร้างเส้นใยในอาหารสีแดงส้ม (Orange red) มีการสร้างสปอร์ลักษณะแบบคดงอเล็กน้อย (rectiflexibilis) ลักษณะโคโลนียกเรียบด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD5-9 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces gelaticus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



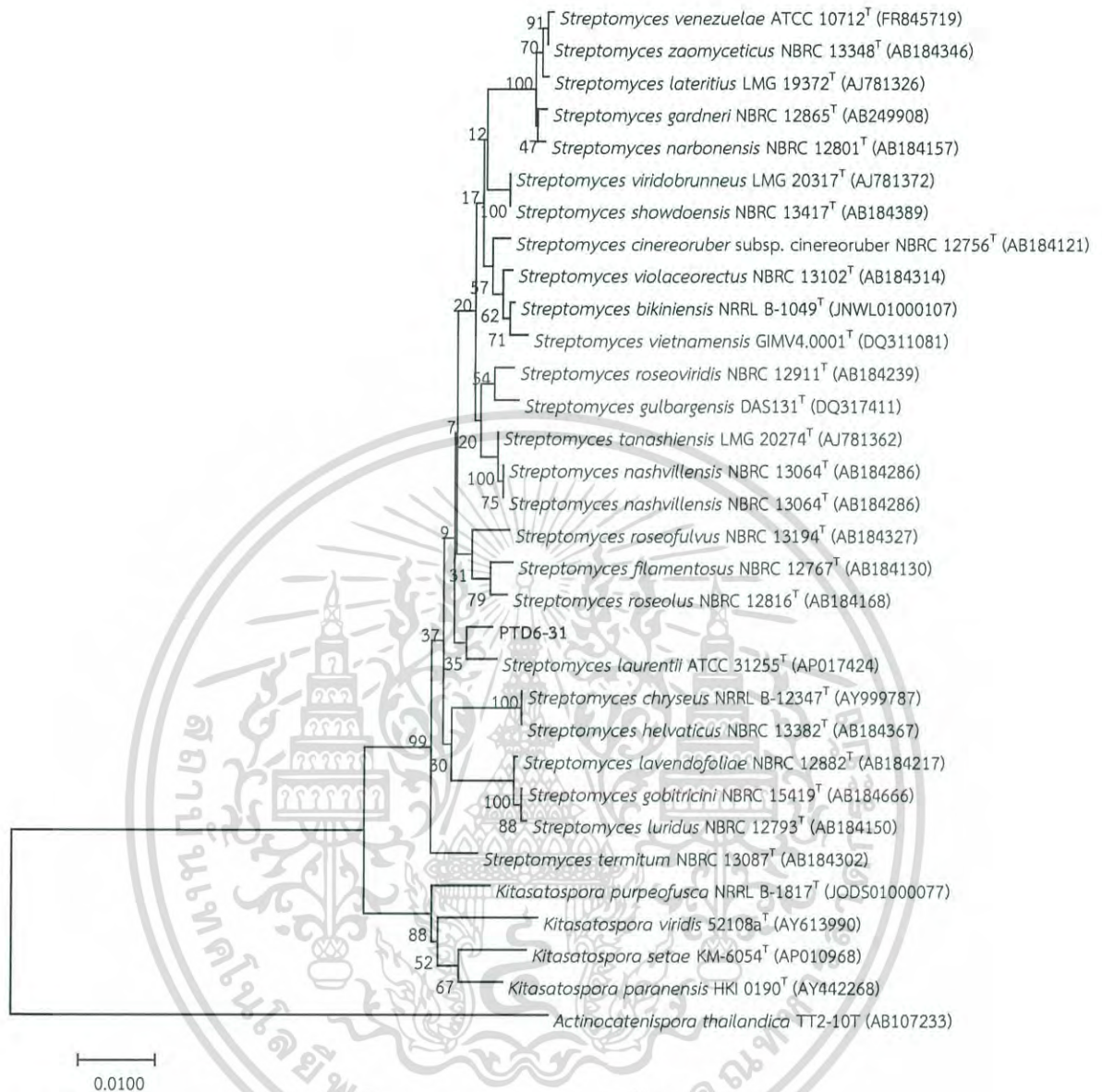
(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.56 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD6-31 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.57 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD6-31 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

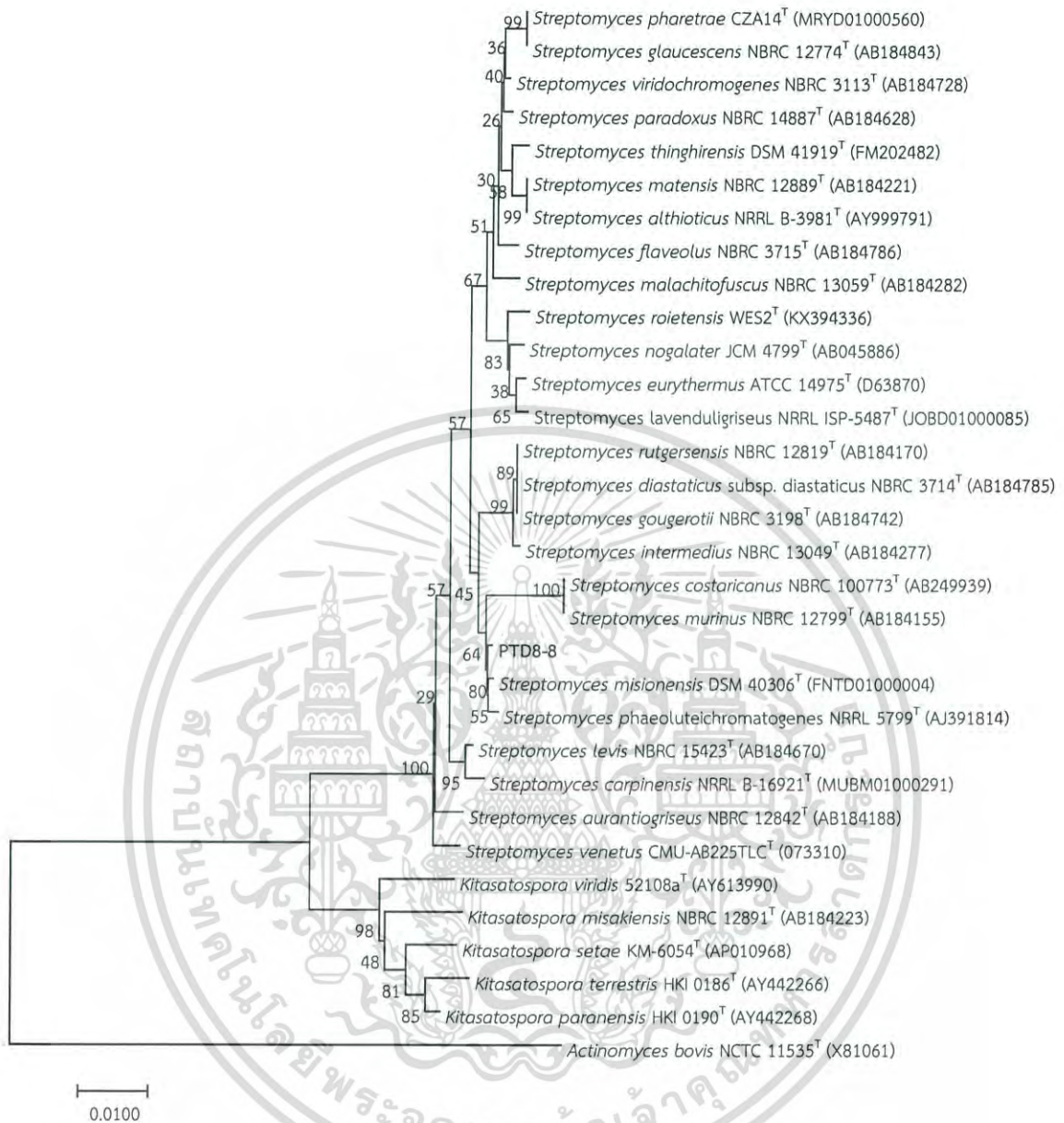
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PTD8-8 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาล จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมดำ (Brownish Black) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวปานกลาง (Moderate Greenish Yellow) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีมะกอกอมน้ำตาลปานกลาง (Moderate Olive Brown) สร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวที่ขดกันแน่น (closed spirals) (รูปที่ 4.58) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD8-8 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.59) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.5% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Cercos และคณะ (1962) พบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเหลือง (yellowish white) สร้างเส้นใยอาหารสีเทาอมเหลือง (yellowish gray) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD8-8 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces misionensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.58 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD8-8 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้น ใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่ง เจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



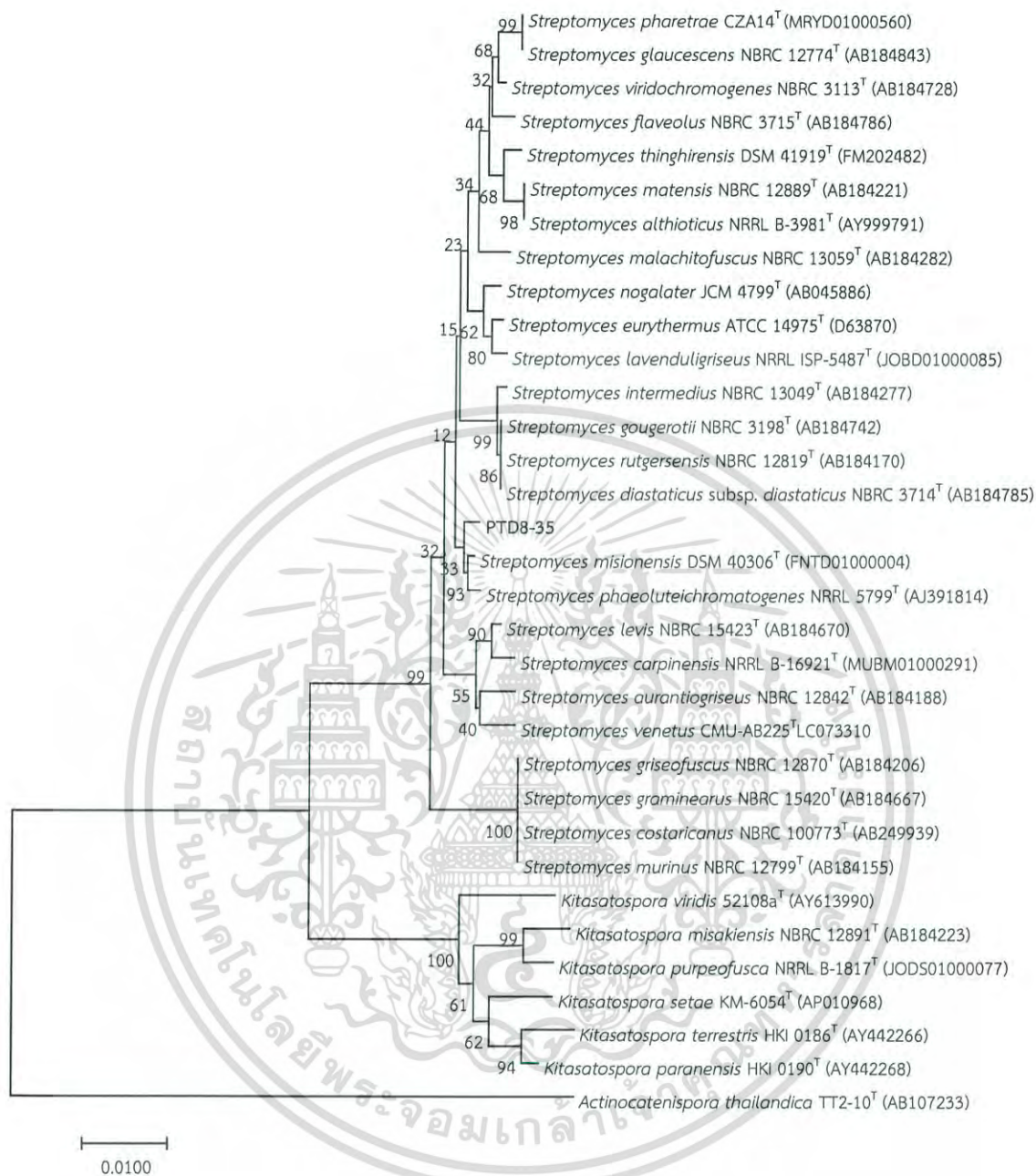
รูปที่ 4.59 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-8 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PTD8-35 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ขอบเรียบ พื้นผิวแข็งและขรุขระ มีเส้นใยอากาศสีน้ำตาล (Moderate Brown) และเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Greenish White) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียววงเปิด (open spirals) (รูปที่ 4.60) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD8-35 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.61) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.5% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Cercos และคณะ (1962) พบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเหลือง (yellowish white) สร้างเส้นใยอาหารสีเทาอมเหลือง (yellowish gray) ด้วยลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD8-35 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces misionensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.60 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD8-35 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



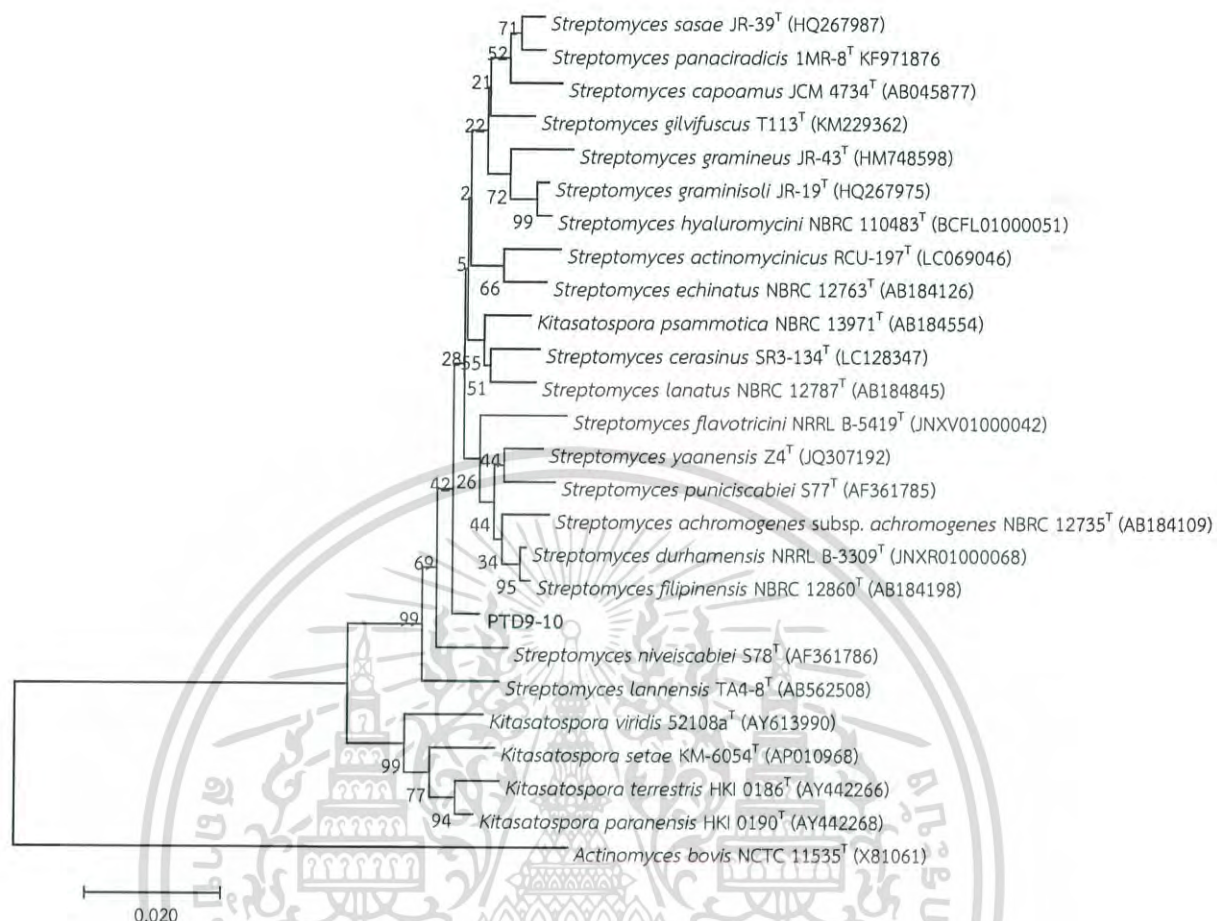
รูปที่ 4.61 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-35 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PTD9-10 แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PTD9-10 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทา (Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลือง (Brilliant Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals) (รูปที่ 4.62) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PTD9-10 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.63) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces sasae* JR-39^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 98.7% (ตารางที่ 4.5) ซึ่งเป็นค่าที่เท่ากับค่าบ่งชี้ระดับความเป็นสปีชีส์ใหม่ (cutoff point) (Chun *et al.*, 2018) จากงานวิจัยของ Lee และคณะ (2015) พบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (gray) เส้นใยอาหารสีน้ำตาล (brown) มีลักษณะโคโลนีที่เรียบ ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง และมีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะคดงอเล็กน้อย (Flexuous) ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวพบว่ามีความแตกต่างกับไอโซเลต PTD9-10 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PTD9-10 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.62 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PTD9-10 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



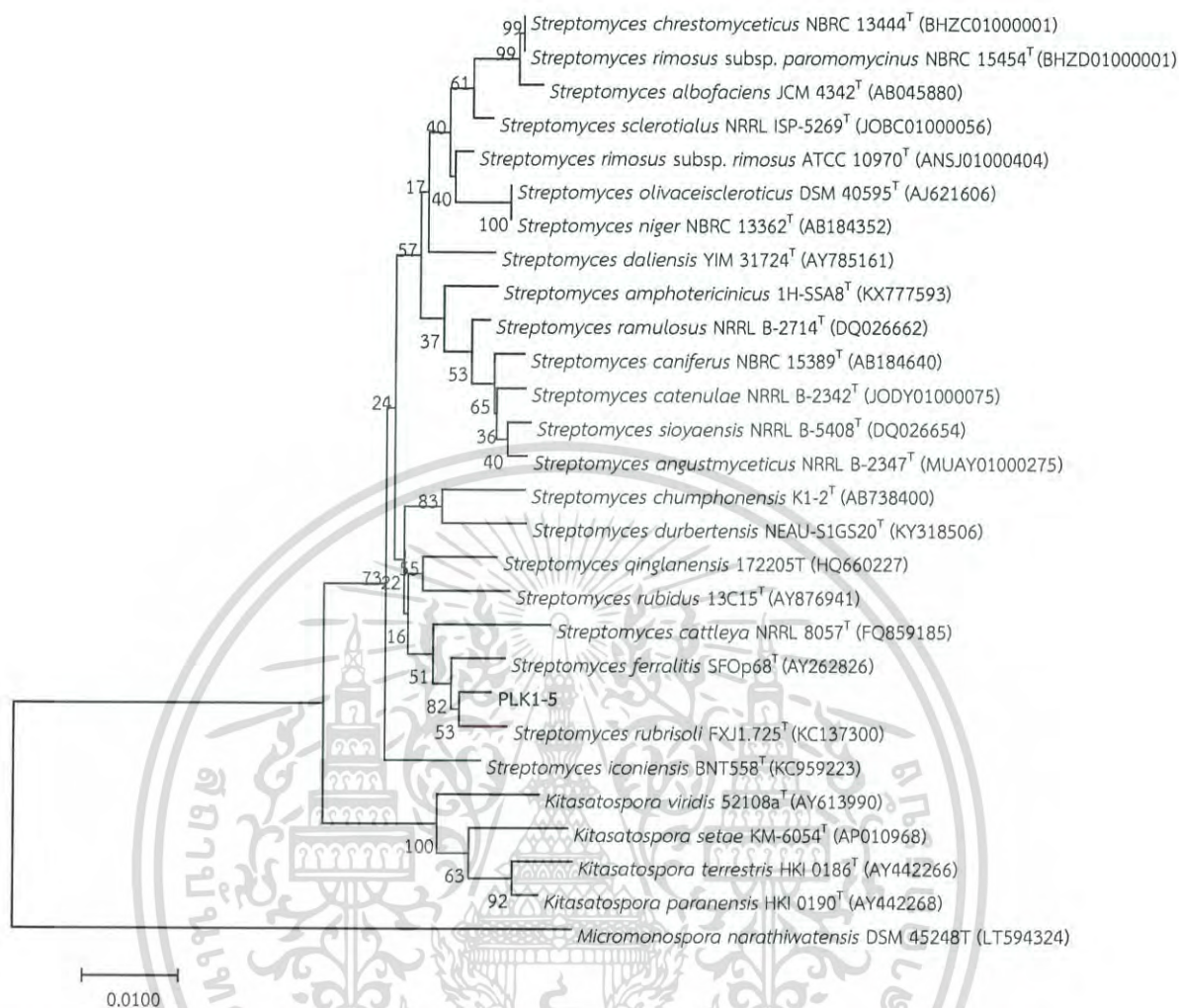
รูปที่ 4.63 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-10 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK1-5 แอคติโนมัยสีทไอโซเลต PLK1-5 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีแข็งและหนูน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทาสว่าง (Light Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารสีเหลืองปานกลาง (Moderate Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยง มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals) (รูปที่ 4.64) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK1-5 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.65) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rubrisoli* FXJ1.725^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.2% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Guo และคณะ (2015) มีการสร้างของเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลือง (yellowish pink) มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียว (spirals) มีลักษณะโคโลนีเรียบ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK1-5 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces rubrisoli* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.64 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK1-5 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



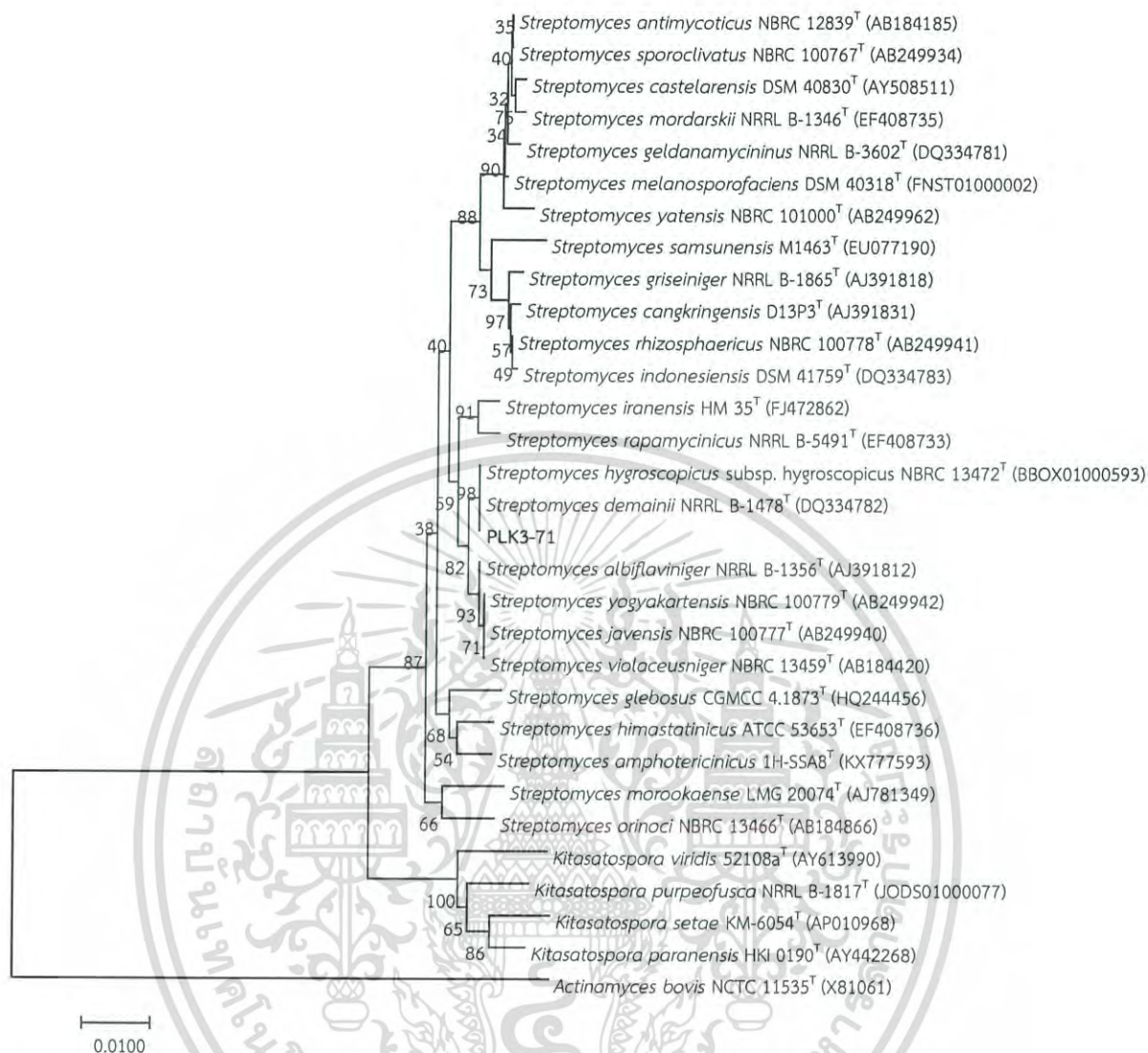
รูปที่ 4.65 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK1-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK3-71 แอคติโนมัยซีทไอโซเลต PLK3-71 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนี นูน ขอบเรียบ มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาวในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้ม (Dark Bluish Gray) เมื่อเส้นใยมีอายุมาก และเส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมส้ม (Brilliant Orange Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียวปลายเปิด (open spirals) (รูปที่ 4.66) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK3-71 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.67) ที่มีความ คล้ายคลึงกับ *Streptomyces demainii* NRRL B-1478^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.8% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Goodfellow และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ *Streptomyces demainii* มีการสร้างสปอร์ เป็นลักษณะเกลียว (spirals) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (gray) จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีดำ (black) และ เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอมเทา (grayish-yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วย ลักษณะทางฟิโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK3-71 มีส่วนคล้ายคลึงกับ *Streptomyces demainii*



รูปที่ 4.66 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK3-71 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่ง เจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



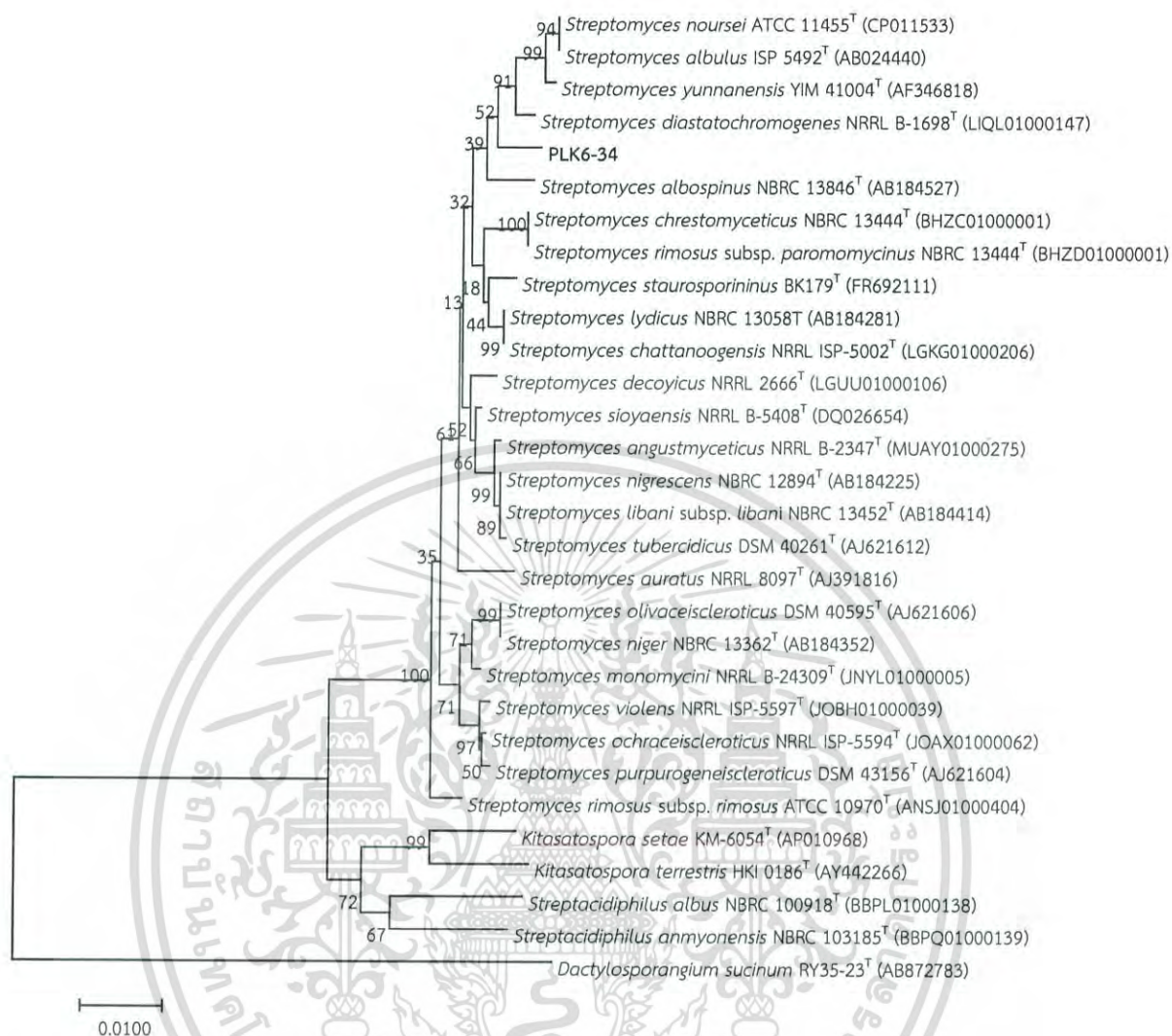
รูปที่ 4.67 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-71 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK6-34 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนีบนและมียอยพับทบกันไปมา ขอบหยัก มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทาสว่าง (Light Gray) และเส้นใยอาหารสีเขียวมะกอกกลาง (Moderate Olive) ไม่มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะตะขวงวงปลายเปิด (open loop) (รูปที่ 4.68) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK6-34 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.69) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albospinus* NBRC 13846^T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.5% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (1966) พบว่ามีการสร้างสปอร์เป็นลักษณะเกลียว (spiral) เส้นใยอากาศสีเทา (gray) ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศและรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-34 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces albospinus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.68 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK6-34 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



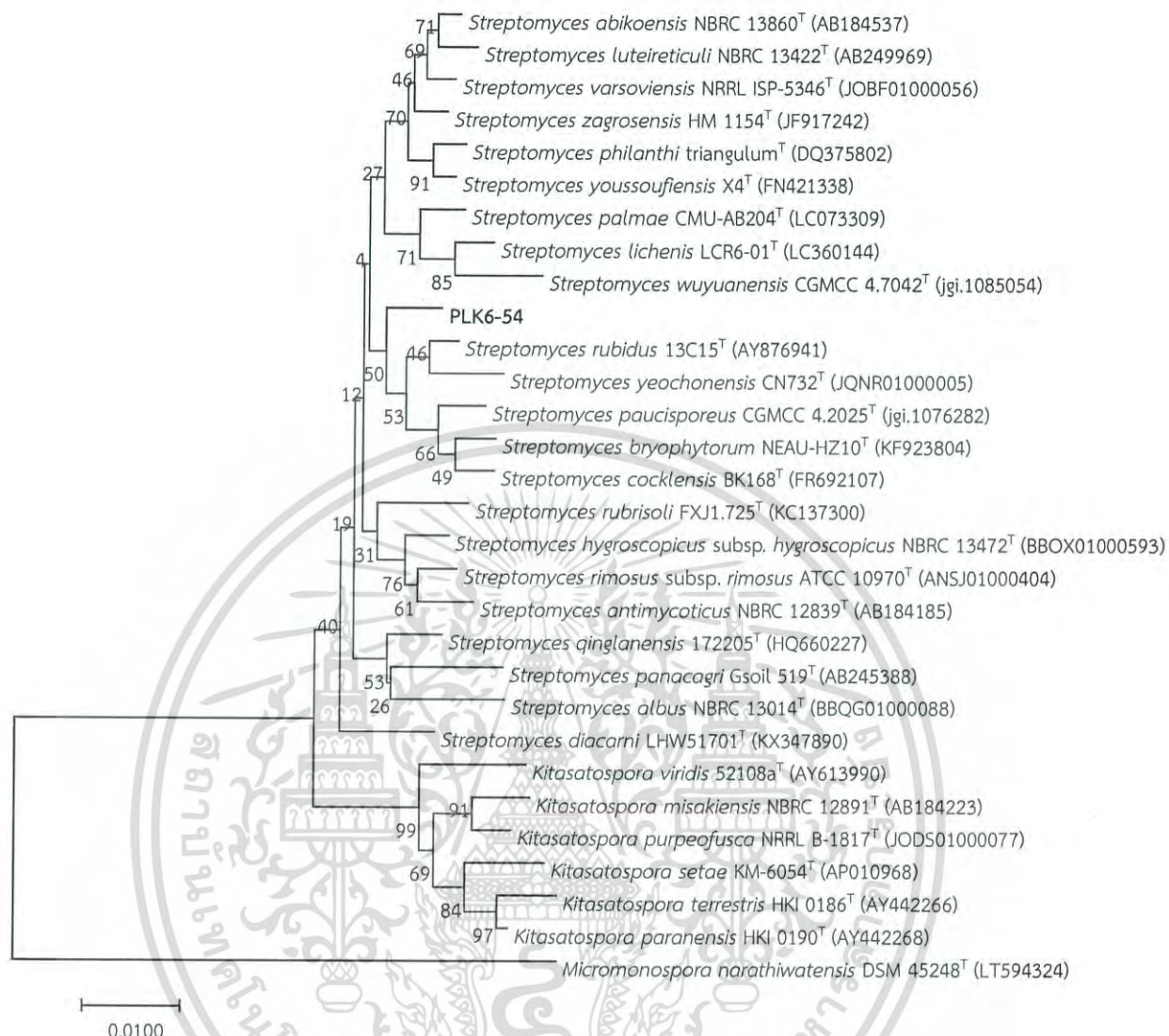
รูปที่ 4.69 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-34 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PLK6-54 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 มีลักษณะโคโลนียกตัวขึ้นเล็กน้อย ผิวมีรอยหย่น ขรุขระ มีเส้นใยอากาศสีน้ำตาล (Strong Brown) และเส้นใยอาหารสีขาวอมเขียว (Greenish White) มีการสร้างรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow) สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายปลายโค้งงอรวมกันเป็นกระจุก (รูปที่ 4.70) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่าไอโซเลต PLK6-54 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.71) ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rubidus* 13C15T ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.0% (ตารางที่ 4.5) จากงานวิจัยของ Xu และคณะ (2006) พบว่า มีการสร้างเส้นใยในอาหารสีน้ำตาล (Mahogany) สร้างสปอร์ที่มีลักษณะคดงอเล็กน้อย (flexuous) และสร้างเส้นใยอากาศและรงควัตถุละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลต PLK6-54 มีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อ *Streptomyces rubidus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด



รูปที่ 4.70 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต PLK6-54 (ค) แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 40 เท่า ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.71 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-54 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกแอสโคไมซีตจากดินป่าพรุได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลต โดย 20 ไอโซเลต แยกได้จากป่าพรุโต๊ะแดง อำเภอสุไหงโกลลก จังหวัดนราธิวาส และ 23 ไอโซเลต แยกได้จากป่าพรุลานควาย อำเภอทุ่งยางแดง จังหวัดปัตตานี

ทำการเลี้ยงแอสโคไมซีต โดยคัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อแบคทีเรียและราก่อโรคได้ดีมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น โดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเป็นแอสโคไมซีตที่จัดอยู่ใน 3 วงศ์ ได้แก่ *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* และ *Streptomycetaceae* โดยแบ่งออกเป็น 3 สกุล ได้แก่ *Micromonospora*, *Microbispora* และ *Streptomyces* โดยแต่ละสกุล มีลักษณะดังนี้

1. สกุล *Micromonospora* เป็นแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารและไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยแอสโคไมซีตจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ PLK3-29 และ PLK6-60
2. สกุล *Microbispora* เป็นแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศที่มีลักษณะแตกกิ่งก้านและสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ บนเส้นใยอากาศ แต่ในการทดลองแอสโคไมซีตสกุลนี้ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน ประกอบด้วยแอสโคไมซีตจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ PTD9-3 และ PLK5-43
3. สกุล *Streptomyces* เป็นแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้านจำนวนมาก สร้างเส้นใยอากาศจำนวนมากและสร้างสปอร์หลากหลายรูปแบบ เช่น สปอร์ที่มีลักษณะคล้ายตะขอยเปิดและสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียว ประกอบด้วยแอสโคไมซีตจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ PTD4-29 PTD5-9 PTD6-31 PTD8-8 PTD8-35 PTD9-10 PLK1-5 PLK3-71 PLK6-34 และ PLK6-54

จากการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแอสโคไมซีตที่คัดเลือกมา 14 ไอโซเลต ได้แก่ PTD4-29 PTD5-9 PTD6-31 PTD8-8 PTD8-35 PTD9-3 PTD9-10 PLK1-5 PLK3-29 PLK3-71 PLK5-43 PLK6-34 PLK6-54 และ PLK6-60 พบว่ามี 1 ไอโซเลต ที่เป็นแอสโคไมซีตสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ PTD9-10 ที่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และมี 6 ไอโซเลตที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ PTD5-9 PTD6-31 PLK1-5 PLK6-34 PLK6-54 และ PLK6-60 ที่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora* ตามลำดับ

จากผลการจัดกลุ่มแอสโคไมซีตตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ พบว่าแอสโคไมซีตที่แยกได้จากป่าพรุทั้งหมด 43 ไอโซเลต มีแอสโคไมซีตที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม *Neutrotolerant acidophile* 15 ไอโซเลต ได้แก่ PTD4-29 PTD5-9 PTD6-13 PTD6-31 PTD7-11 PTD8-8 PTD8-35 PTD9-4 PLK1-1 PLK1-8 PLK1-45 PLK3-71 PLK6-39 PLK6-44 และ PLK6-54 จัดอยู่ในกลุ่ม *Acidotolerant neutrophile* 24 ไอโซเลต ได้แก่ PTD4-11 PTD4-13 PTD4-16 PTD5-6 PTD8-4 PTD8-9 PTD8-10 PTD8-21 PTD8-37 PTD8-41 PTD9-10 PLK1-6 PLK1-7 PLK1-12 PLK3-
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29 PLK3-34 PLK3-94 PLK3-115 PLK4-13 PLK5-43 PLK6-34 PLK6-38 และ PLK6-60 จัดอยู่ในกลุ่ม Neutrophile 4 ไอโซเลต ได้แก่ PTD 9-3 PLK3-27 PLK3-28 และ PLK6-77

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยการนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยซีตมาใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรค ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, VRE ATCC 15555, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. rhizophila* ATCC 9341, *Ent. faecium* ATCC 51559, MRSA และ *C. albicans* ATCC 10231 ซึ่งพบว่ามี 5 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ได้ ได้แก่ PTD4-29 PTD6-31 PTD9-10 PTD1-5 และ PTD3-71

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคด้วยวิธี Dual culture โดยการเลี้ยงแอคติโนมัยซีตร่วมกับราก่อโรคในพืช *Fusarium* sp. พบว่ามี 8 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรคในพืชได้ ได้แก่ PTD 4-29 PTD 5-9 PTD 8-8 PTD 8-10 PTD 8-35 PLK 1-5 PLK1-12 และ PLK 6-34 โดยไอโซเลต PTD8-8 สามารถยับยั้งราก่อโรคได้สูงสุดที่ 76.11%

การทดลองนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษากิจกรรมทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากดินป่าพรุที่มีต่อแบคทีเรียและราก่อโรค โดยพบว่าแอคติโนมัยซีตที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราก่อโรค และมีความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงยังสามารถค้นพบแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดินจากป่าพรุเป็นแหล่งศึกษาทางธรรมชาติที่น่าสนใจ สำหรับการค้นหาแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปพัฒนาสำหรับใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในทางการเกษตรและการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc., New York. 472p.

Berdy, I. 2005. Bioactive Microbial metabolites. *J. antibiot.* 58: 1-26

Bergey's manual of determinative bacteriology. (2000). *Actinomycetales*. 9th ed.

Bouček-Mechiche, K., et al. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with Common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 91-99.

Chen, Y.G. Zhang, Y. Q. Tang, S.K. Liu, Z. X. Xu, L.H. Zhang, L.X. et.al. (2010). *Nocardiopsis terrae* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from saline soil. *Journal Science Engineering*, 98, 31-38.

David, G. H. G. 1959. "The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition." *J. Gen. Microbial.* 21 : 612-621

Hayakawa, M., et al. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 320-326

Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood. 2000. Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA, pp. 161-210. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England

Kumar, S., et. al. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformat.* 17(12): 1244-1245

Li, C. et al. (2016). "*Streptomyces bryophytorum* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from moss (Bryophyta)." *Antonie van Leeuwenhoek.* 9: 1209-1215.

Lo, C.W., Lai, N.S., Cheah, H.Y., Wong, N.K.I. and Ho, C.C. 2002. "Actinomycetes Isolated from Soil Samples from the Crocker Rang Sabah." *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*. July-Sept, 2002.

Niyasom, C Boonmak, S. and Meesri, N. 2015 "Antimicrobial Activity of Acidophilic Actinomycetes Isolated from Acidic Soil." *Sci. Tech. J.* 15(2).

Poomthongdee, N. Duangmal, K. and Pathomaree, W. 2015 "Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plant" *the Journal of Antibiotics.* 68 : 106-114.

Prapagdee, B., K. Chutima and S. Mongkolsuk. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 330-337.

Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Silambarasan, S. Praveen kumar, E. Muragan,T. and Balagurunathan, R. 2012

“Antibacterial and Antifungal Activities of Actinobacteria Isolated from Rathnagiri Hills.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(10) : 99-103.

Thawai, C., et al. 2004. *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., Isolate from a peat swamp forest in Thailand. *Ancinomycetologica*. 18: 8-14

Thawai, C., et al. 2005. *Micromonospora eburnea*. sp. nov., Isolate form a Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 55: 417-422

Thawai, C., et al. 2005. *Micromonospora siamensis* sp. nov., Isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbial*. 51: 229-234

Thawai, C., et al. 2007. *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J. Gen. Appl. Microbial*. 53: 287-293

Thawai, C., et al. 2010. *Actinaurispora siamensis* gen.nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 60: 1660-1666

Songsumanus, A., et al. 2011. *Micromonospora humi* sp. nov., Isolated from peat swamp forest soil. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 6: 1176-1181

Waksman, A. 1967. The Actinomycetes: A summary of current knowledge. The Ronald Press Company. New York. 250 p.

Wang, Y.M., Zhang, Z.S., Xu, X.L., Ruan, J.S. and Wang, Y. (2001). *Actinopolymorpha singaporensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51, 467-473.

Zakaiyukina, Y.V. and Zenova, G.M. 2007 “Antagonistic Activity of Soil Acidophilic Actinomycetes” *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya*. 34(4) :329-332.

Zhao, G.Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y.Q., Zhu, W.Y., Jiang, C.L., Xu, L.H. and Li, W.J. 2009. *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized polyspora axillaris roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 59: 2383–2387.

Zhi, X.Y., Li, W.J. and Stackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new soborders and four new families and emended descriptions of existing higher taxa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 59:589-608.

กัญญศิริ มณีสุวรรณ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทีสจากดินที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เกศแก้วกลยา วงษ์สวัสดิ์, ปัทมวิภา กาตวิบูลย์ และ สุพิชา แสงสว่าง. (2555). การคัดกรองและ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสที่แยกจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- งามนิจ นนทโส. (2537). การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากดิน. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.
- จิตติ ท้าว. (2557). แอคติโนแบคทีเรียเทคนิคการแยกและคัดเลือกเชื้อ. โรงพิมพ์บริษัทแดเน็กซ์อินเตอร์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ. 296 หน้า
- ตรุณี เทพปาน. (2541). การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วชิร ใจภักดี. 2544. การคัดแยกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารต้านทานเชื้อราจากดินในประเทศไทย และตรวจลำดับเบสของยีน 16S rDNA. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 หน้า.
- นันทวัน เนียมหอม. (2555). ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. (2544). ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯ: โอเดียมสโตร์.
- สายสมร ล้ายอง และนิตยา บุญทิม. (2541). การใช้ pretreatment technique ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเอนไซม์ไคตินเอสในดิน. มหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Zhang's starch soil extract agar (ZSSE) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

Soluble starch	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม
Soil extract solution	1.0	ลิตร
Agar	18.0	กรัม
pH 5.5 (ปรับด้วยกับ 0.1 M HCl)		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	50.0	มิลลิกรัม
Nystatin (ละลายใน 100% DMSO)	100.0	มิลลิกรัม

Soil extract solution

ตัวอย่างดินป่าพรุ	1.0	กิโลกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที		
กรองด้วยสำลีแล้วนำส่วนใสไปใช้		
นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาทีอีกครั้ง		

Starch Casein Nitrate Agar (SCN) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

Sodium caseinate	0.5	กรัม
Soluble starch	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2	กรัม
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 5.5 (ปรับด้วยกับ 0.1 M HCl)		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	50.0	มิลลิกรัม
Nystatin (ละลายใน 100% DMSO)	100.0	มิลลิกรัม

Yeast extract – malt extract agar (International *Streptomyces* Project2; ISP2)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที		

Potato Dextrose Agar (PDA)

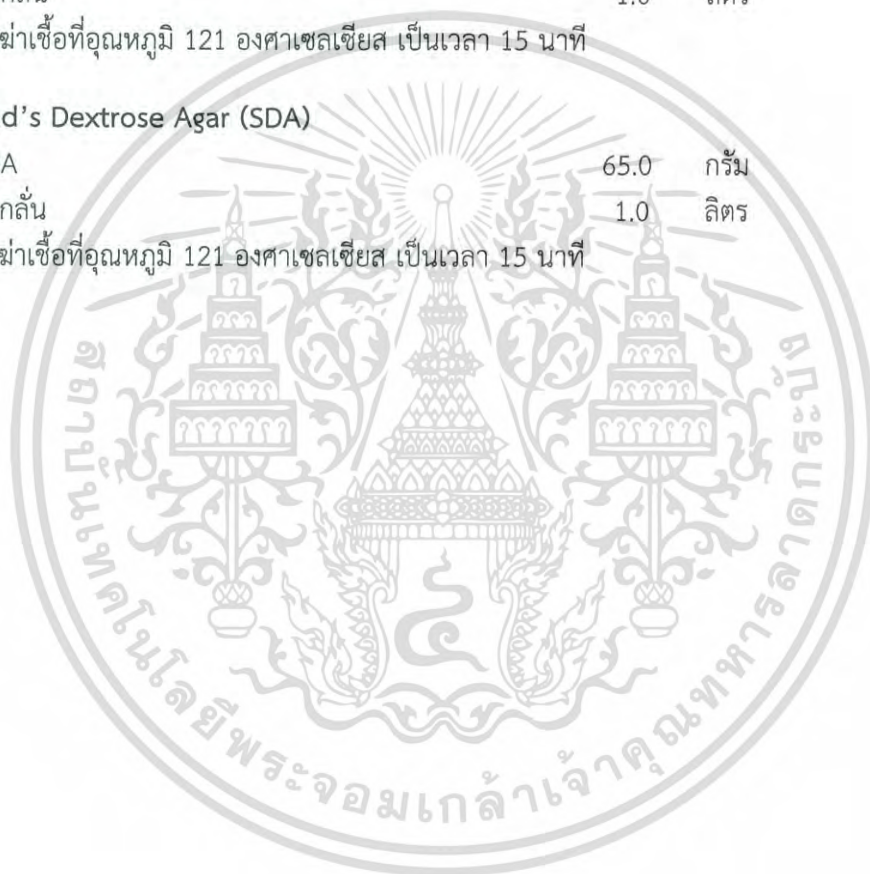
PDA	39.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

Mueller-Hinton Agar (MHA)

MHA	38.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

SDA	65.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

0.01% Basic lauryl sulfate (SLS)

Na-lauryl sulfate	0.1	กรัม
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม

0.01% Tween 80

Tween 80	0.1	กรัม
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม



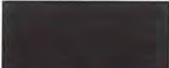
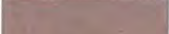
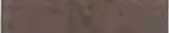
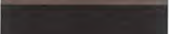
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
กระดาศสีมาตรฐาน

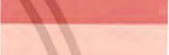
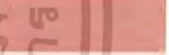
กระดาศสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color system, Mundie 1995)

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

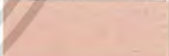
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	

Yellowish Pink

25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	

Reddish Orange, Reddish Brown

33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C



Orange Brown

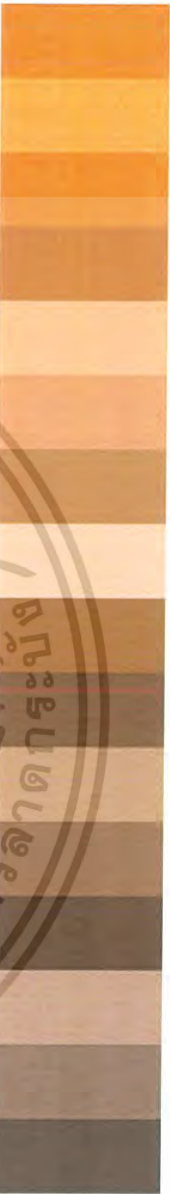
48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A



63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C
------------------------	---------------	---------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B
Orange Yellow, Yellowish Brown		
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F
Yellow, Olive Brown		
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	
Greenish Yellow, Olive			
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910



Yellow Green, Olive Green

115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931



Yellowish Green

130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E
-------------------------------	--------------	---------



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513

Bluish Green

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

Greenish Blue

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blue

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



Purplish Blue

194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้หรือเผยแพร่ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51



Violet

205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B



Purple

216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

266 Dark Gray

2.5pb 3.5 0.0

#49423D

267 Black

2.5pb 0.8 0.0

#131313



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

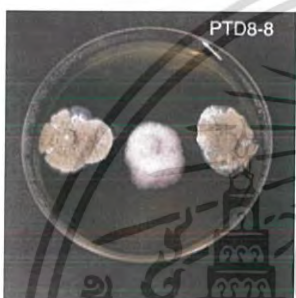
ภาพแสดงไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium sp.*



ไอโซเลต PTD4-29



ไอโซเลต PTD5-9



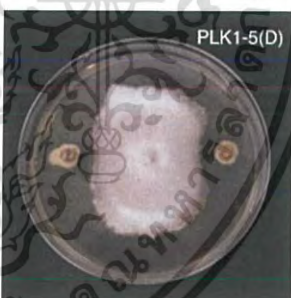
ไอโซเลต PTD8-8



ไอโซเลต PTD8-10



ไอโซเลต PTD8-35



ไอโซเลต PLK1-5



ไอโซเลต PLK1-12



ไอโซเลต PLK6-34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอสตินโนไมด์ที่คัดเลือก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK6-34

AGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGATGAACCGGCTTCGGTCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACACGGA
GGCATCTTCTGTGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
GCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTG
AAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATC
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCT
CTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGC
ATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA
CCGGAAAACCTCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAG
CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATG
CCTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
TCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCG
ATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACC
CCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG
AGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGG
TGCCTGA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK5-43

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGG
TGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGG
AAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCATGGAGCGCATGCTTTGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGC
AGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA

GAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCTGA
TACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCG
ACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGAGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACGCCGGTAACCCCTGGAGACAGGGGGCCCCCTTGTGG
TCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACGGGAGACTG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGC
ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCC
GGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCTCTAGTAATCGCAGATC
AGCAGTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGT
AACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGG
GACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไฮโซเลต PLK3-29

CTGGCTCAAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGG
GTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCTGGCACCGCATGGTGTGGGTGGAAAGTTTTTCGGCCT
GGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCTGACTGTGAAAACCCACGGCTCAACCGTGGGCCTGCAGTCGA
TACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG
GCCTCTCCGGTTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCTGCAGAGATGTGGGGTCCTTCGGGG
GCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTC
AACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGC
TACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCCAAAAGCCGGTCTCAG
TTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCCCGAAAGTCGGCAACACCC
GAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK1-5

AGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCATGGAGCG
CATGCTTTGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGG
GTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCA
AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
GCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAA
GCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTG
GGCCGATACTGACGTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATT
AAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACA
AGAGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACGCCG
GTAACCCCTGGAGACAGGGGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTC
GTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCC
TTCGGGGTGTATGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATA
CCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA
TGAAGTCGGAGTCTCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGG
GAATCGTC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD5-9

CTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTA
ACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACCACTTCGTCC
CGCATGGGATGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTG
GGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA
TGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCG
CAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTGTGTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCG
 GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTC
 TGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCA
 TTAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
 CGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC
 TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGC
 CTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT
 CAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA
 TGTCTGTGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
 CATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA
 GGGAGCTGTGAAAGGTGGGACTGGCGATTGGGAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK6-54

GGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGAATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGC
 TTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCCCTTCGGGGTGGAGCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCGC
 TGACCGCATGTTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGT
 GGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
 CCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTCAGCAGGGGAAG
 AAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGA
 TGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCTCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGA
 GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
 ATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTA
 ACGCATTAAAGTTCCTCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
 TACACCGGAAAGCGCCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTG
 TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTTGCCAG
 CAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
 ACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCT
 GCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG
 ACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
 CTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG

เอก...การคำ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TGGGAGGGAGTCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGG
AAGGTGCGGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD9-10

CTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTA
ACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGCTTCCAA
GGCATCTTGAGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA
TGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGATTGTGA
AAGCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTTGGTAGGGGAGATCG
GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTC
TGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCA
TTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCA
CAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
CGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGC
CCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA
TACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
CATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAAG
GAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK6-60

AGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGA
AAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAGGCTTT
GGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTTGATCGCATGATGTCTTGGTGGA
AAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAT
TTATGGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCGACCGTGAAAACCTTGGGGTCAACTCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำ
ไปใช้ในการค้า หรือเผยแพร่ในที่สาธารณะได้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูง

AAGCCTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTG
 AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGC
 GCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGG
 AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGG
 ATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAACTGTCAGAGATGGC
 AGGTCCTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT
 TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAA
 GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGG
 GCTTCACGCATGCTACAATGGTCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAA
 AAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
 CAGATCAACAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA
 GTCGGCAACACCCGAAG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD8-8

GCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCT
 TAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG
 TGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCGTC
 TTGGGCATCCTTGACGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTG
 GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCC
 TGATGCAGCGACGCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAA
 GCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT
 AGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTG
 TGAAAGCCCGGGGCTTAACCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGA
 TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT
 CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 GTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGCTAAC
 GCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCC
 GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATA
 CACCGGAAAGCATTAGAGATAGTCCCCCCTTGTTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC
 AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTTGCCAGC
 AGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGA
 CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTG
 CGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGA
 CCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
 TTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACCAGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGA
AGGTG

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD4-29

GGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGC
TTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
GTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCAT
CTTGGGCATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTT
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTT
GTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGA
TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAA
CGCATTAAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT
ACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAG
CAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCT
GCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG
ACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCACCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG
TGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACCAGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGG
AAGGTGCGGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD9-3

TCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA
CACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGA
GTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTC
GCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTG
GGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGA
CGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTT
GACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

AAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGGTCTGCCGTGAAAGC
 CCGTGCGTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGG
 CCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGC
 GCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
 GCGGAGCATGTTGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAAC
 ACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGAAGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGG
 GGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTG
 AGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAG
 TCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
 CGCCCGTCACGTACGAAAGTCNGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTTGGGGGGAGCG
 GTCGAAAGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD6-31

GGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTG
 TTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTG
 CCGAGGCATCTTGGCGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTT
 GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGG
 GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
 CTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGGT
 GTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATCCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAG
 ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGA
 TCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
 AGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAA
 CGCATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 CGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT
 ATACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTTGGTGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
 CAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGC
 ATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
 ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCT
 GCGATGCCGTGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG
 ACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารตัวอย่าง ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGT
GGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGA
AGGTGCGGCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PLK3-71

CAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
GGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGCCG
ACCGCATGGTCTGGTGGTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTG
GTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGA
AGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGAT
GTGAAAGCCCGGGGCTTAACCTCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGA
TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAA
CGCATTAAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT
ACATCGGAAACCTCTGGAGACAGGGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGC
ATGCCCTTTGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCT
GCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCG
ACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGT
GGAGCGAGCCGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAACGTAGCCGTACCGGAA
GGTGCGGCTGGATCAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA ของไอโซเลต PTD8-35

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGT
GGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGGTCTAATACCGGATATGACCGTCTTGGGCATCCTTGACGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCA
GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC
GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

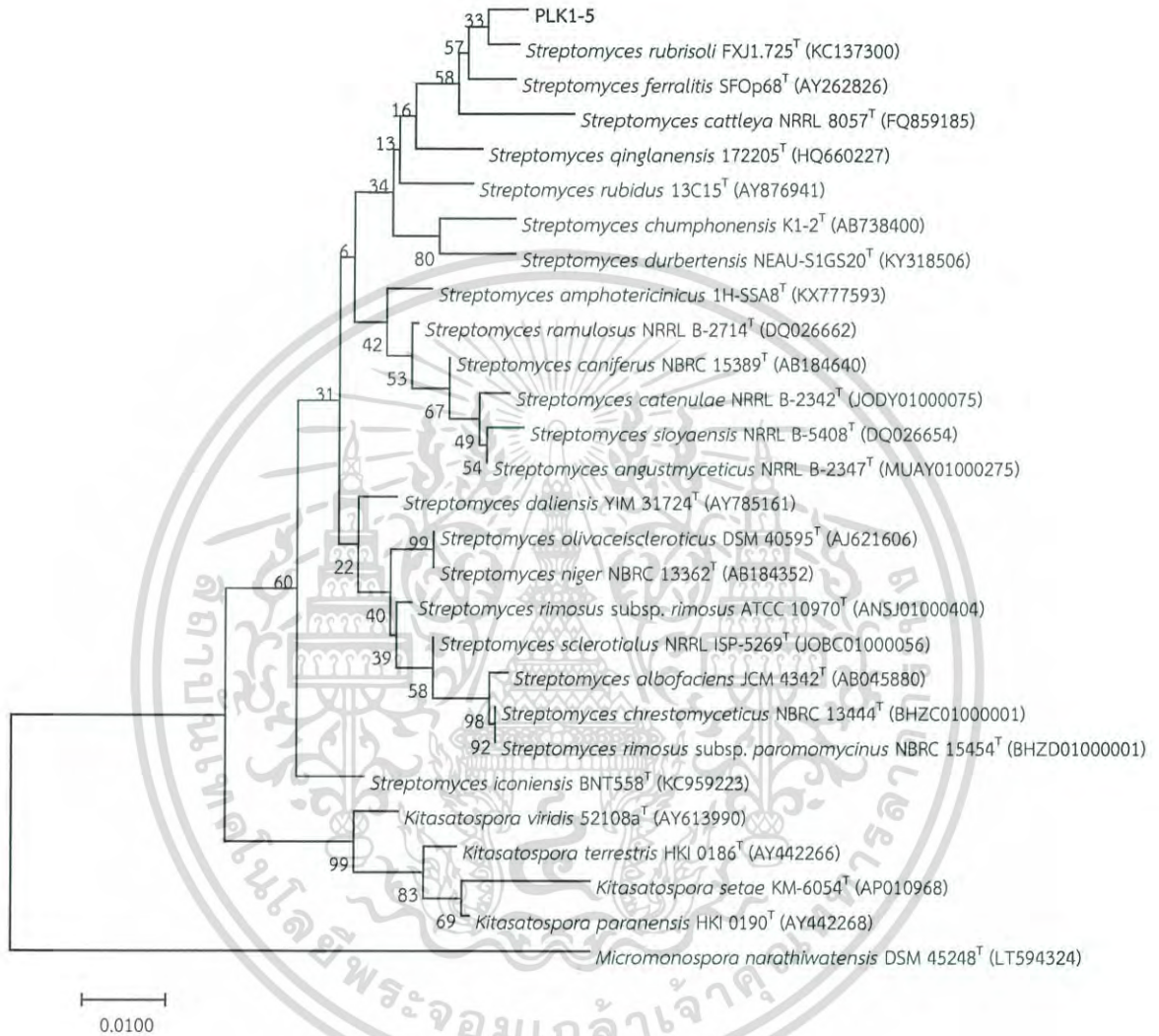
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 AGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGAT
 ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
 CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAA
 CATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 CTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAA
 CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTC
 GGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCG
 GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACA
 CGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGT
 CTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGC
 ATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACA
 CCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACCAGCGATTGGGACG
 AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGCTG



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

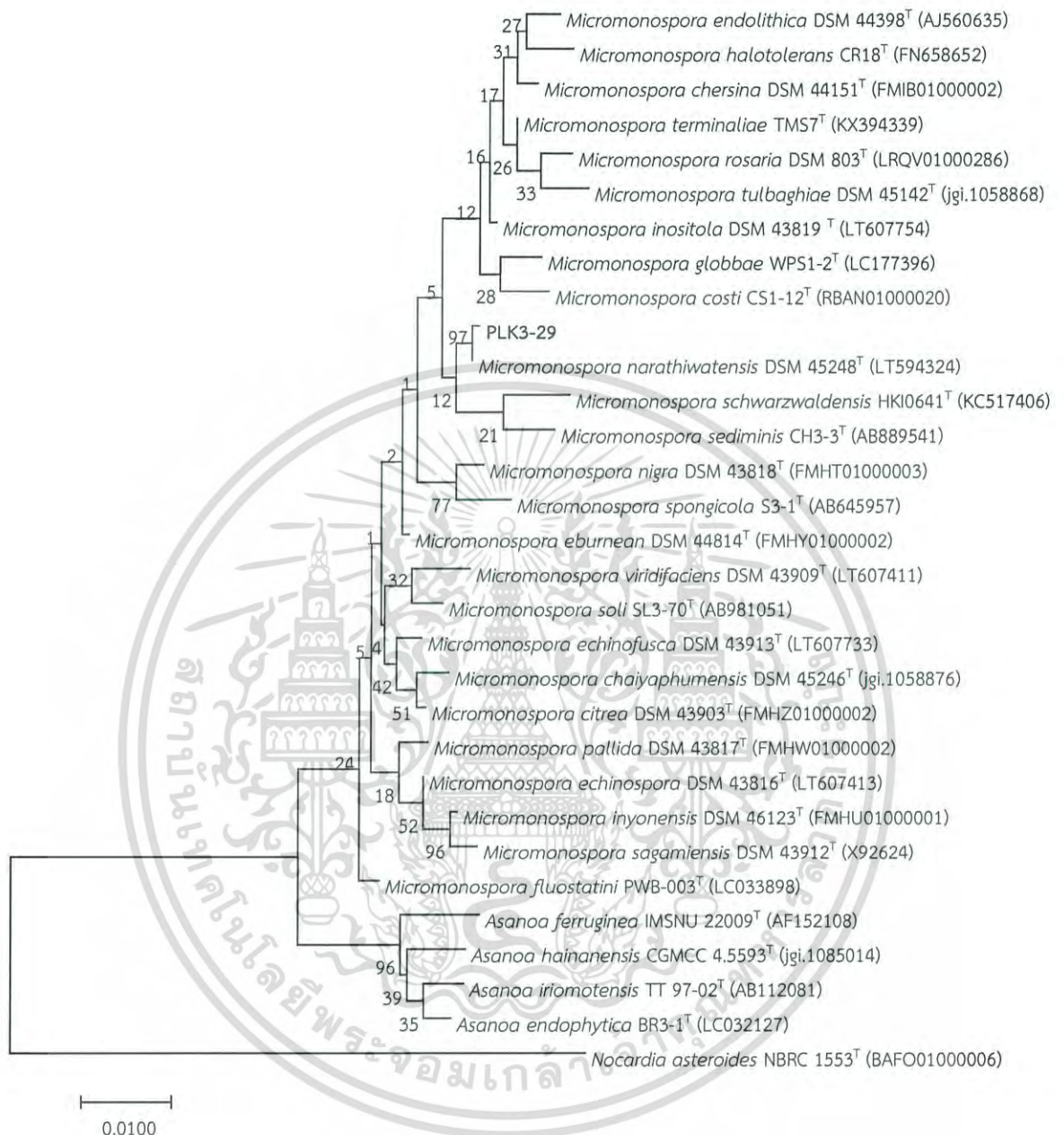
ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี maximum likelihood



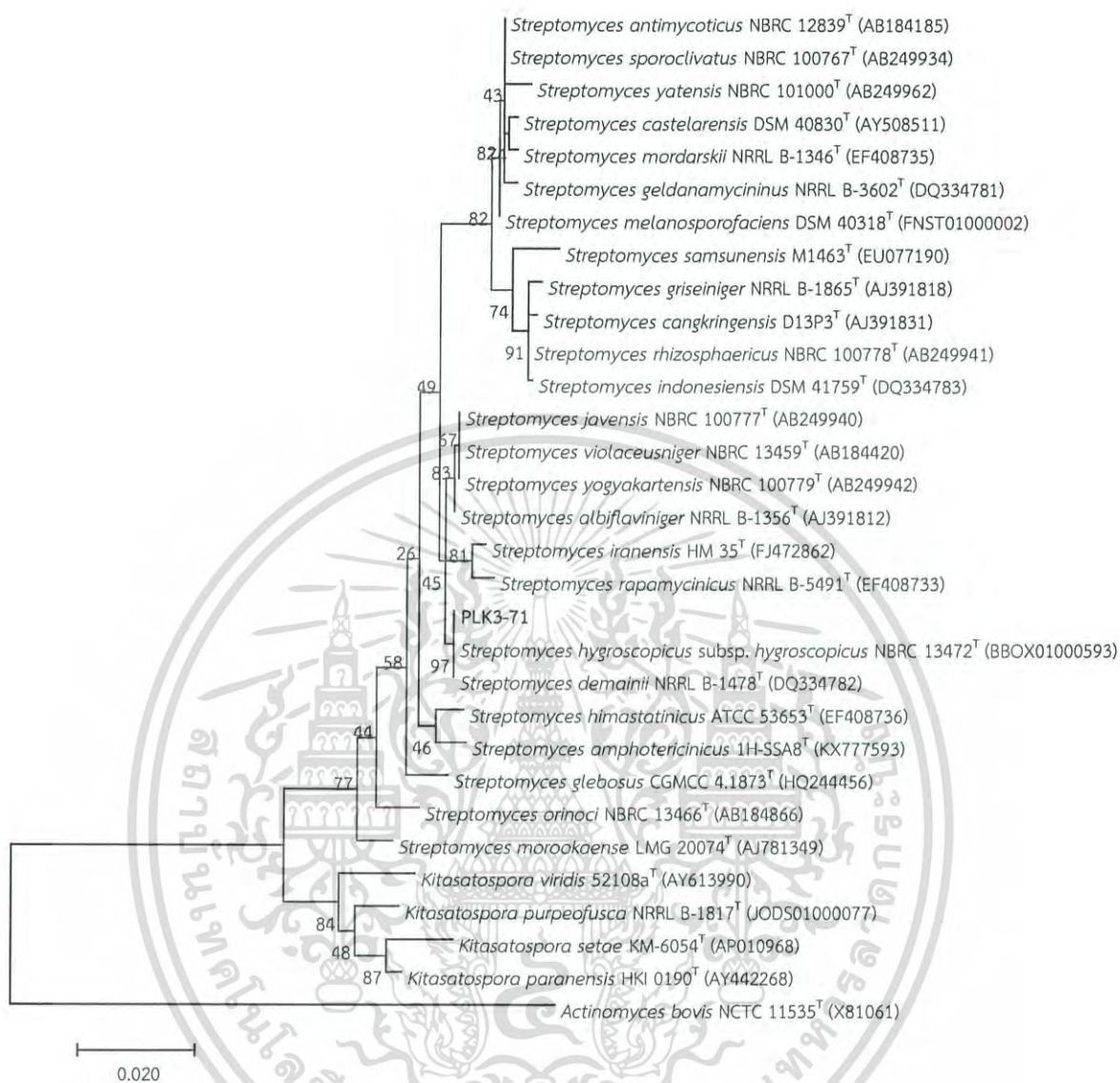
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK1-5 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



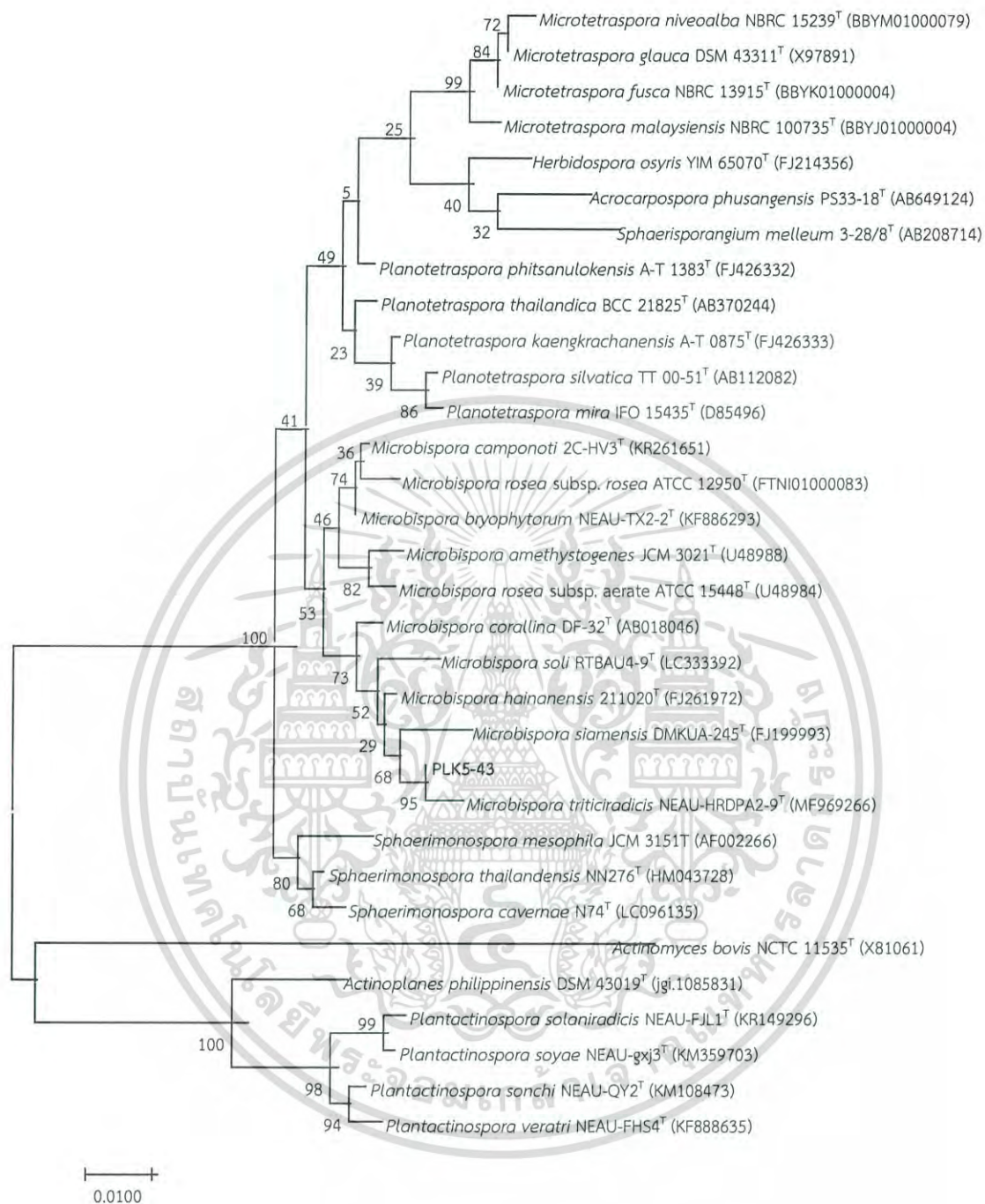
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-29 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



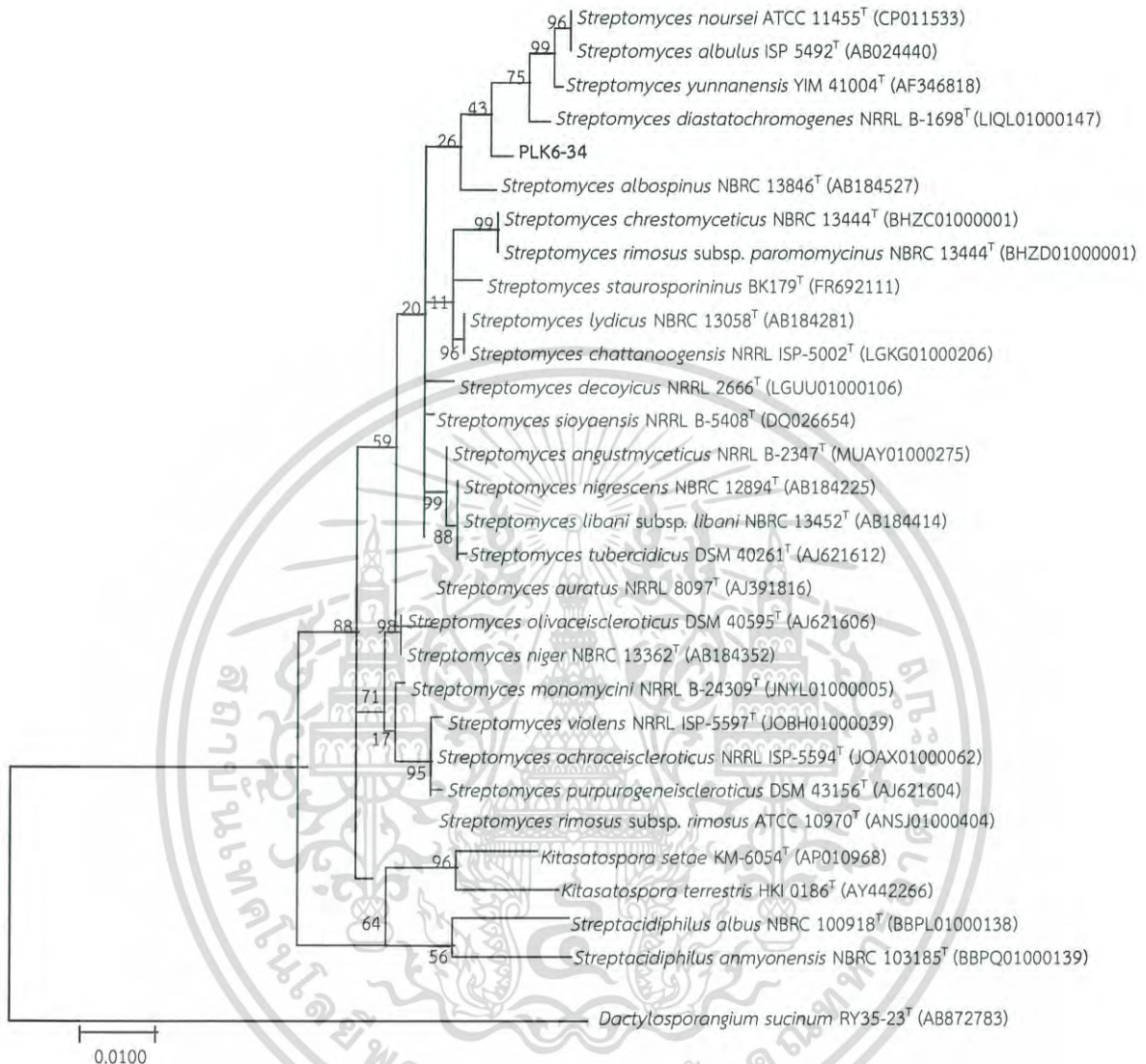
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-71 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



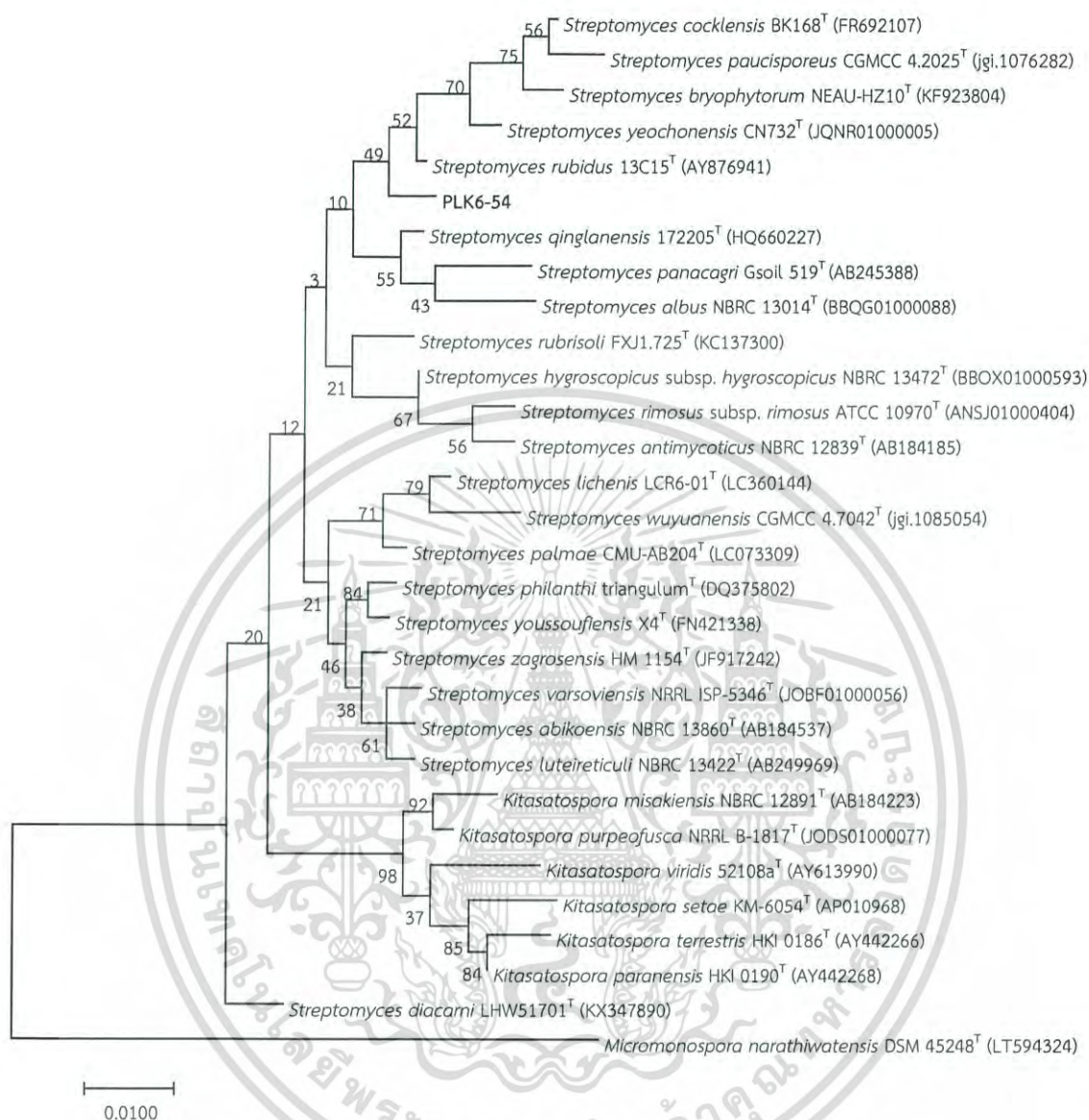
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK5-43 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



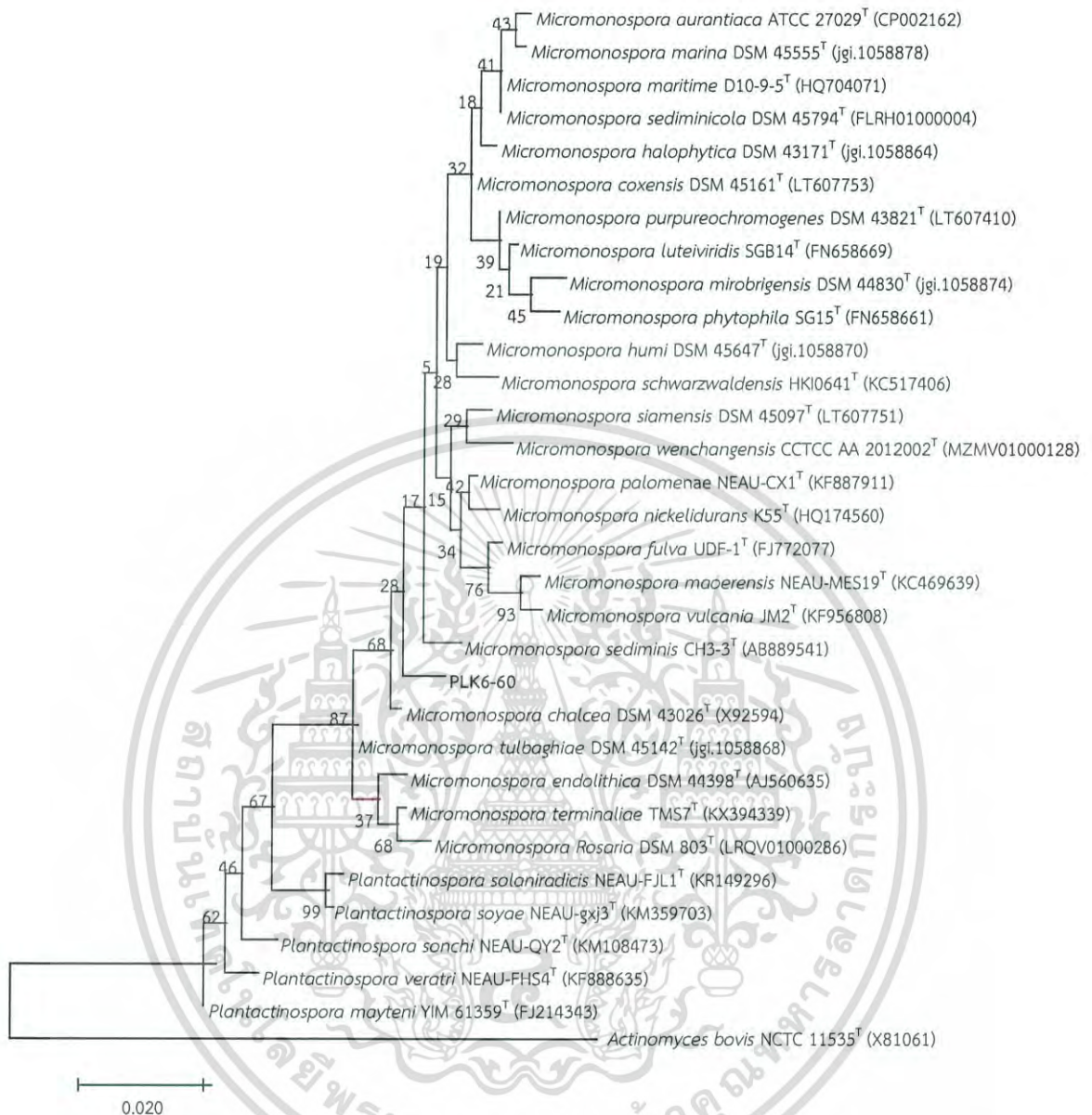
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-34 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



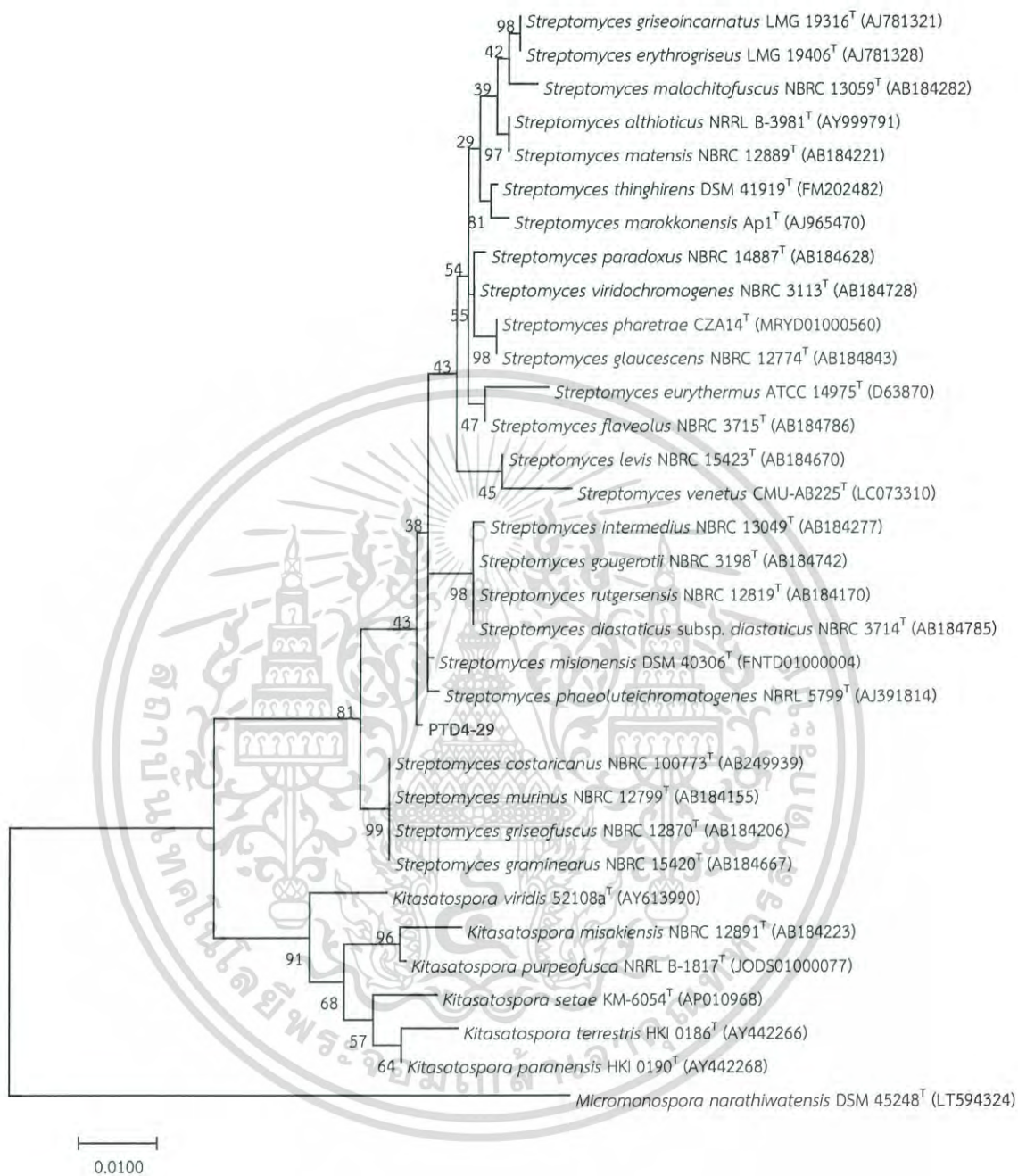
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-54 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



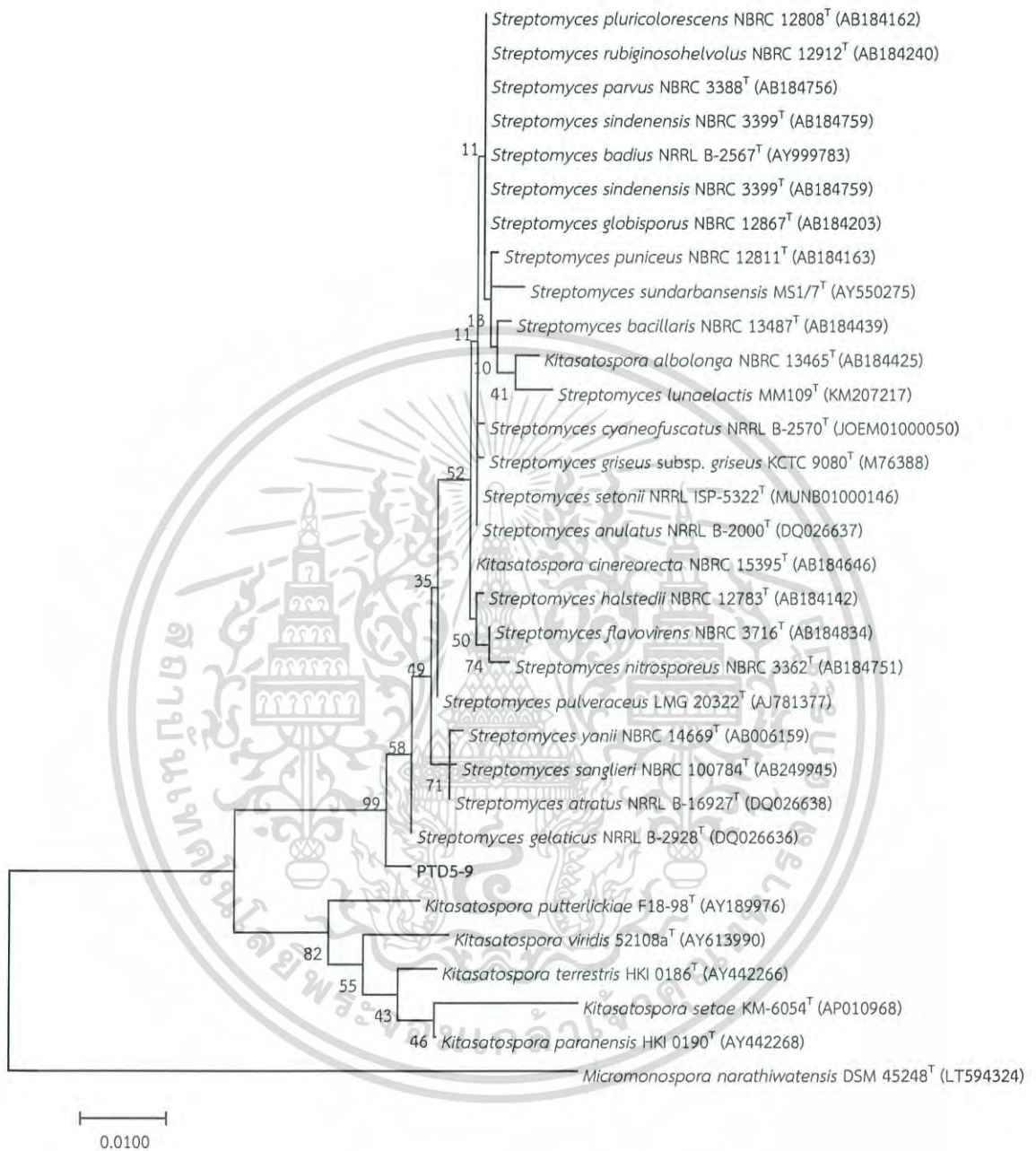
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-60 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



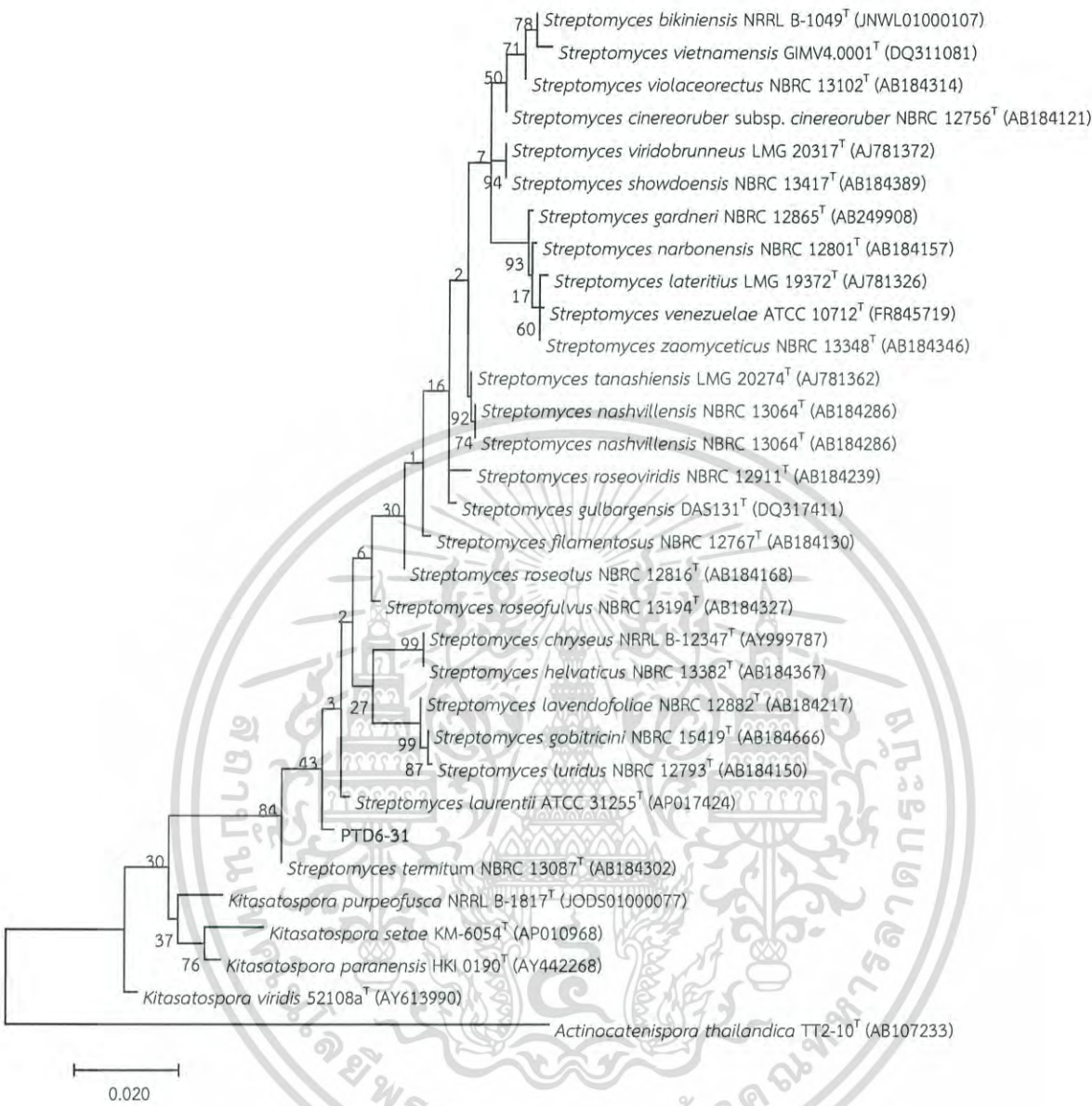
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD4-29 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



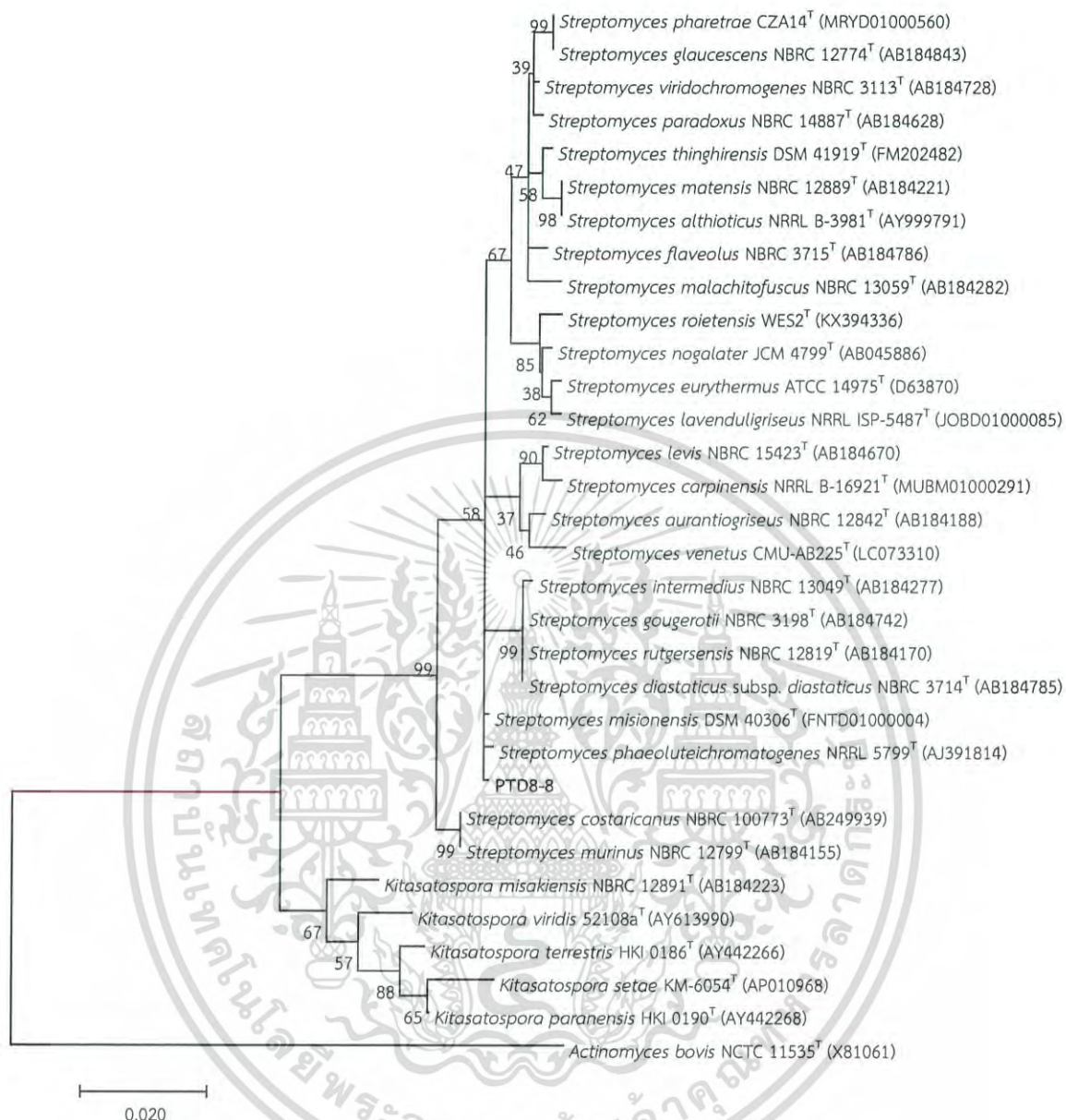
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD5-9 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



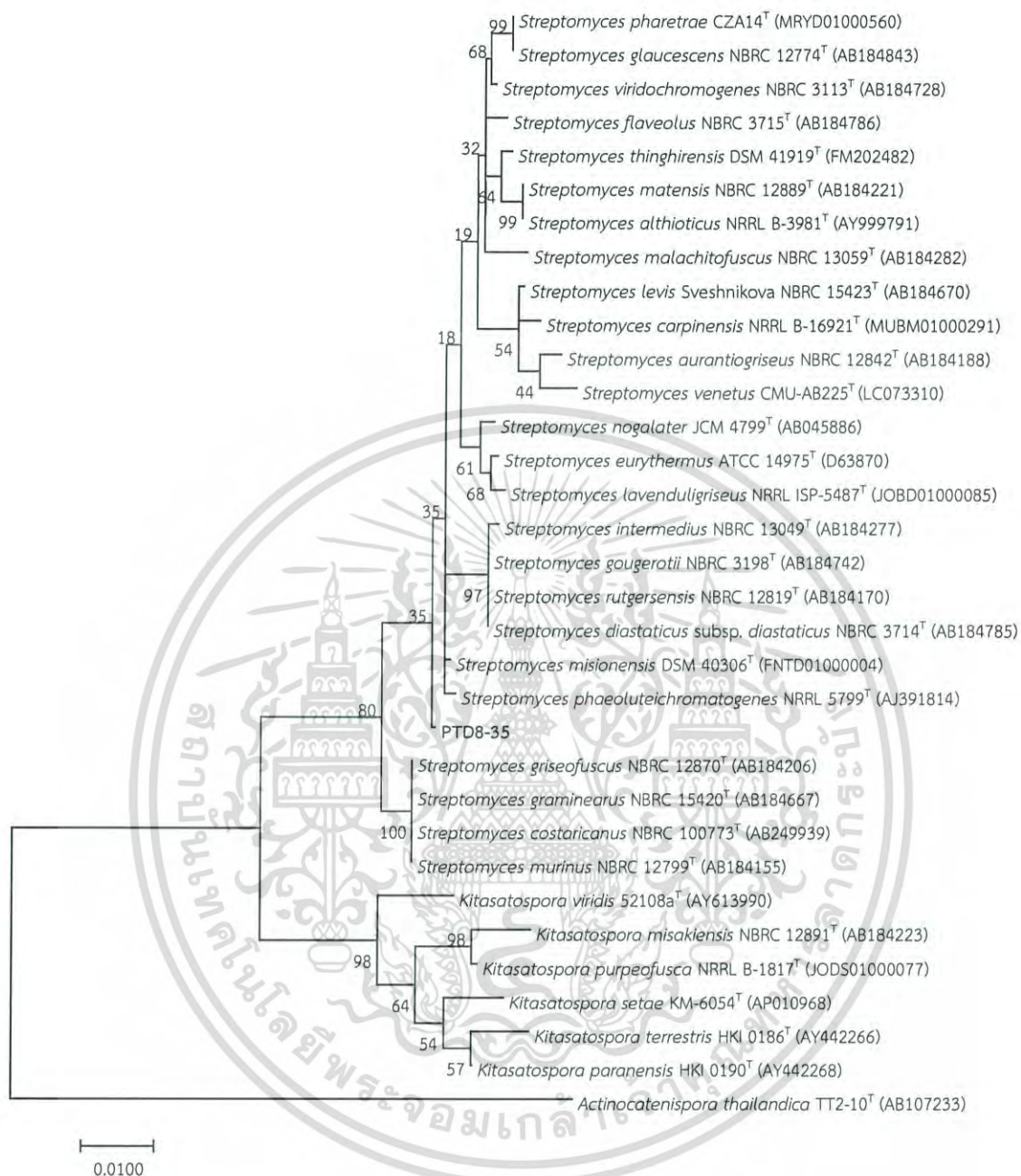
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD6-31 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



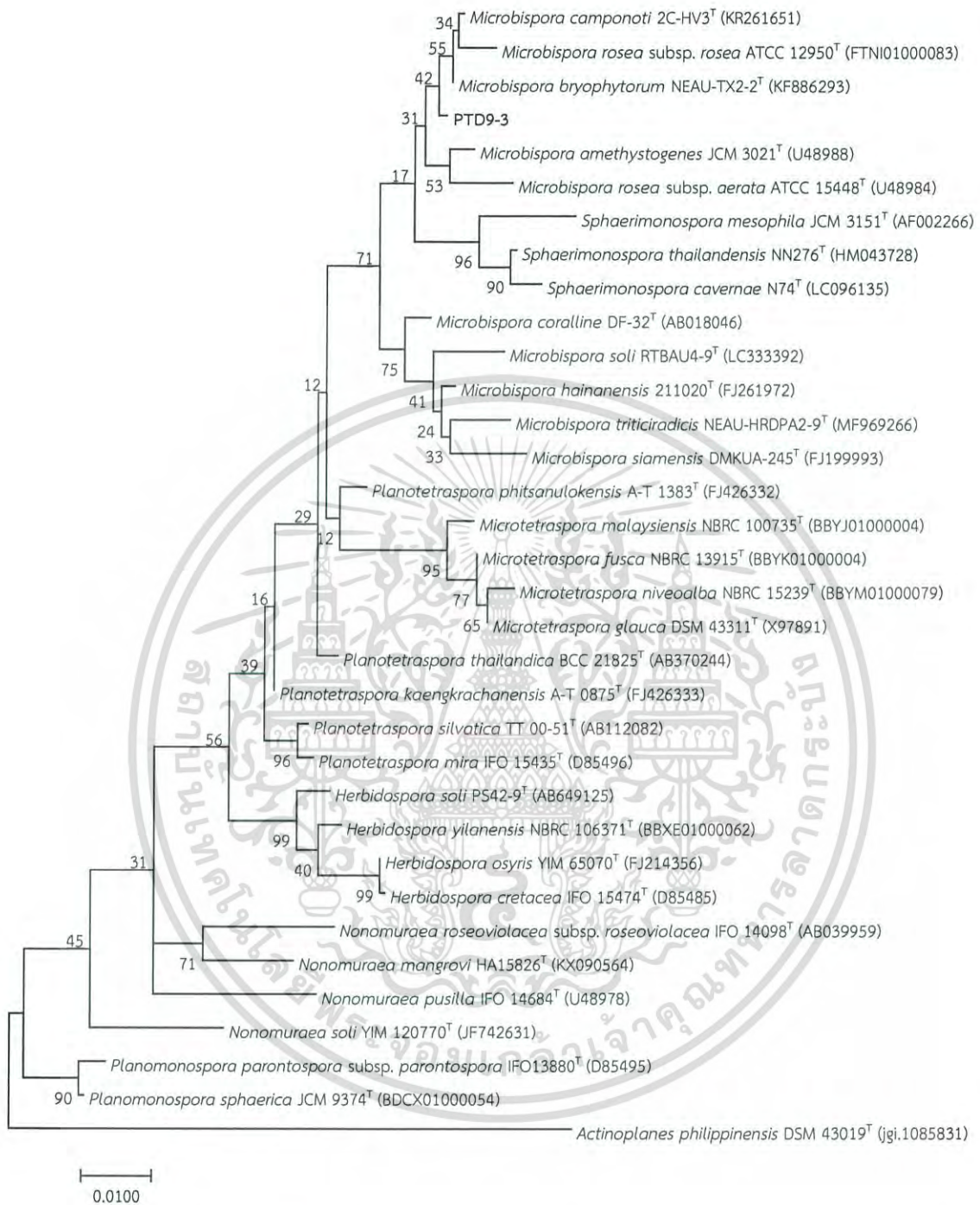
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-8 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



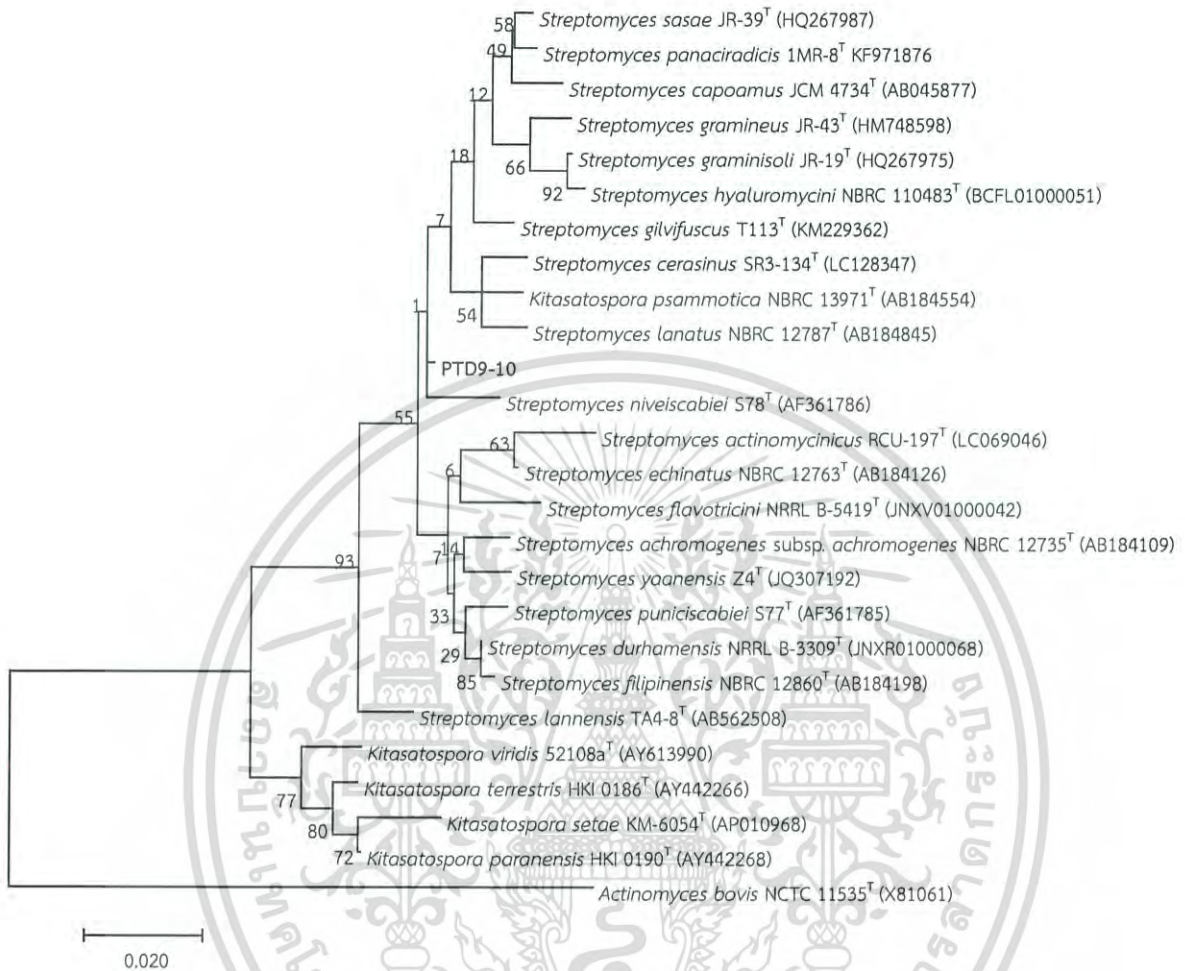
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-35 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-3 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-10 บน phylogenetic tree (maximum likelihood method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

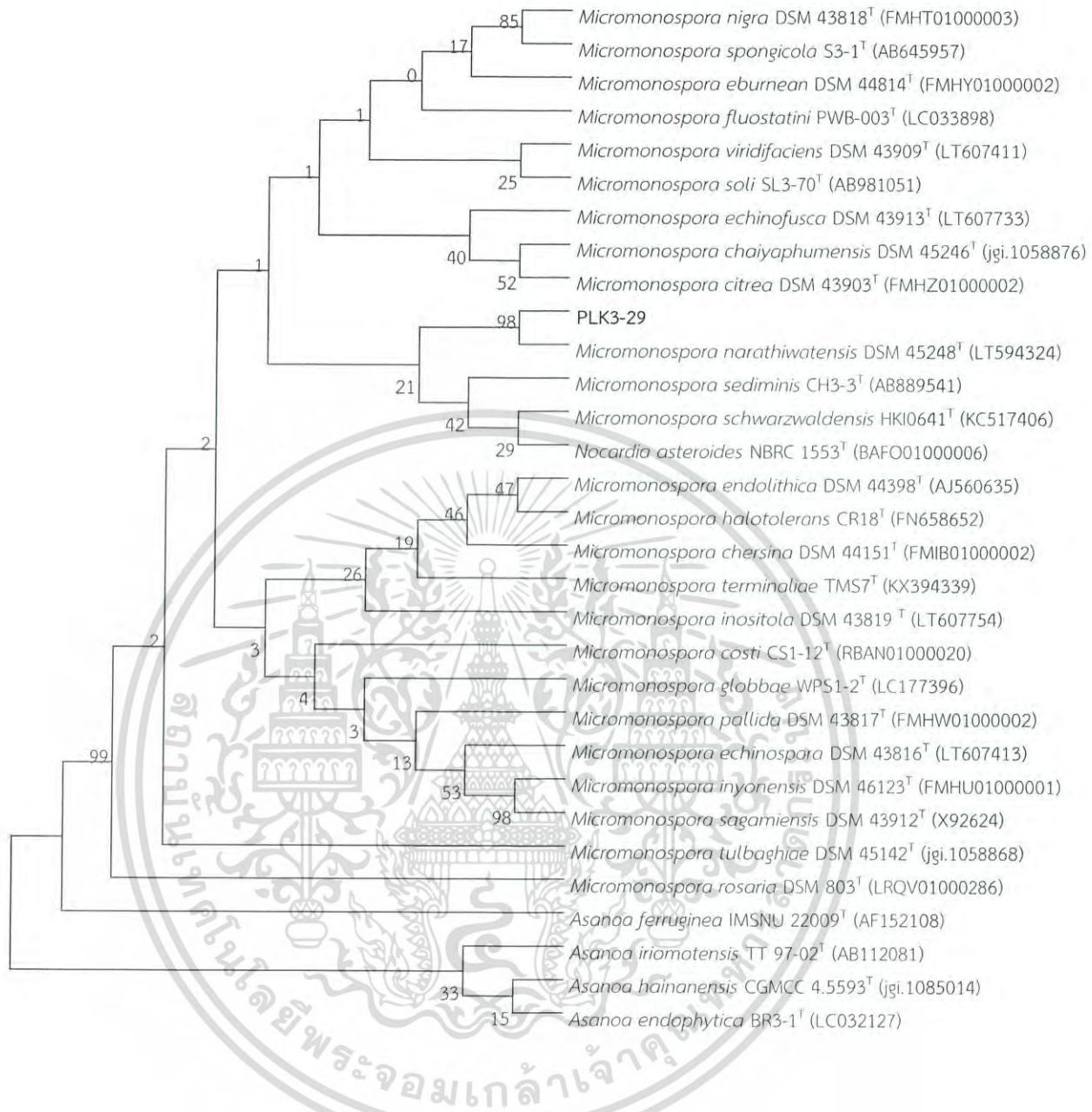
ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี maximum parsimony



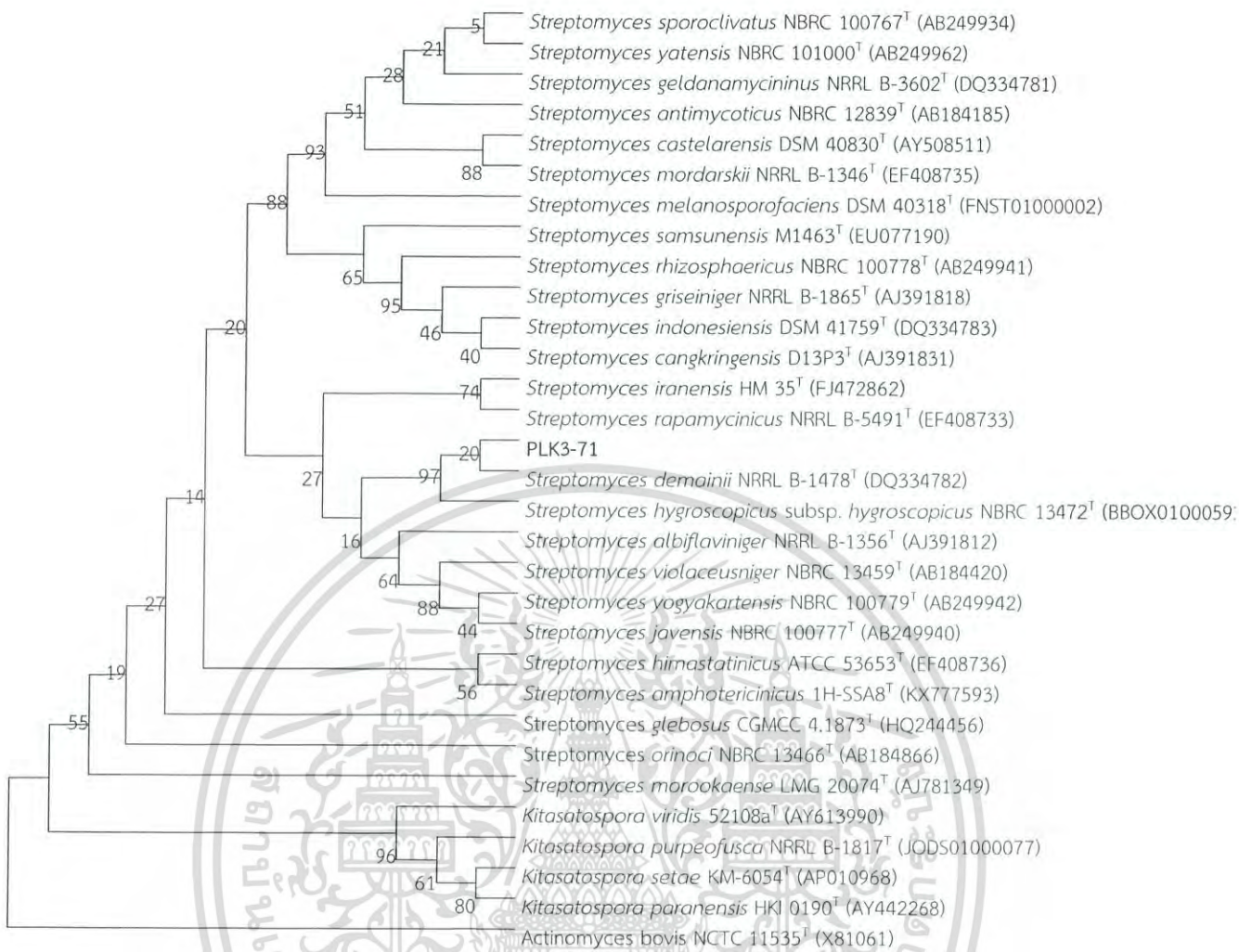
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK1-5 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



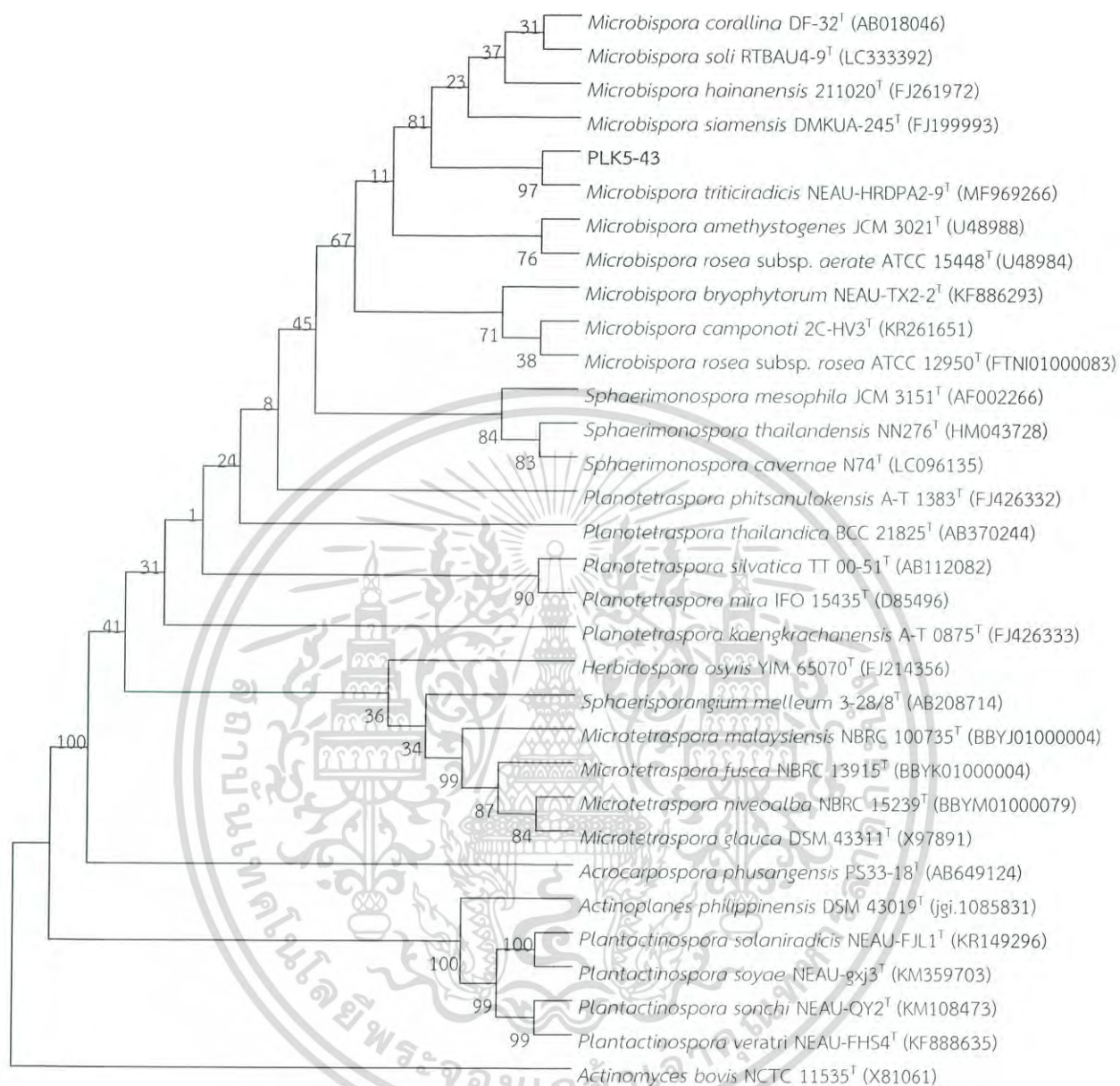
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-29 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



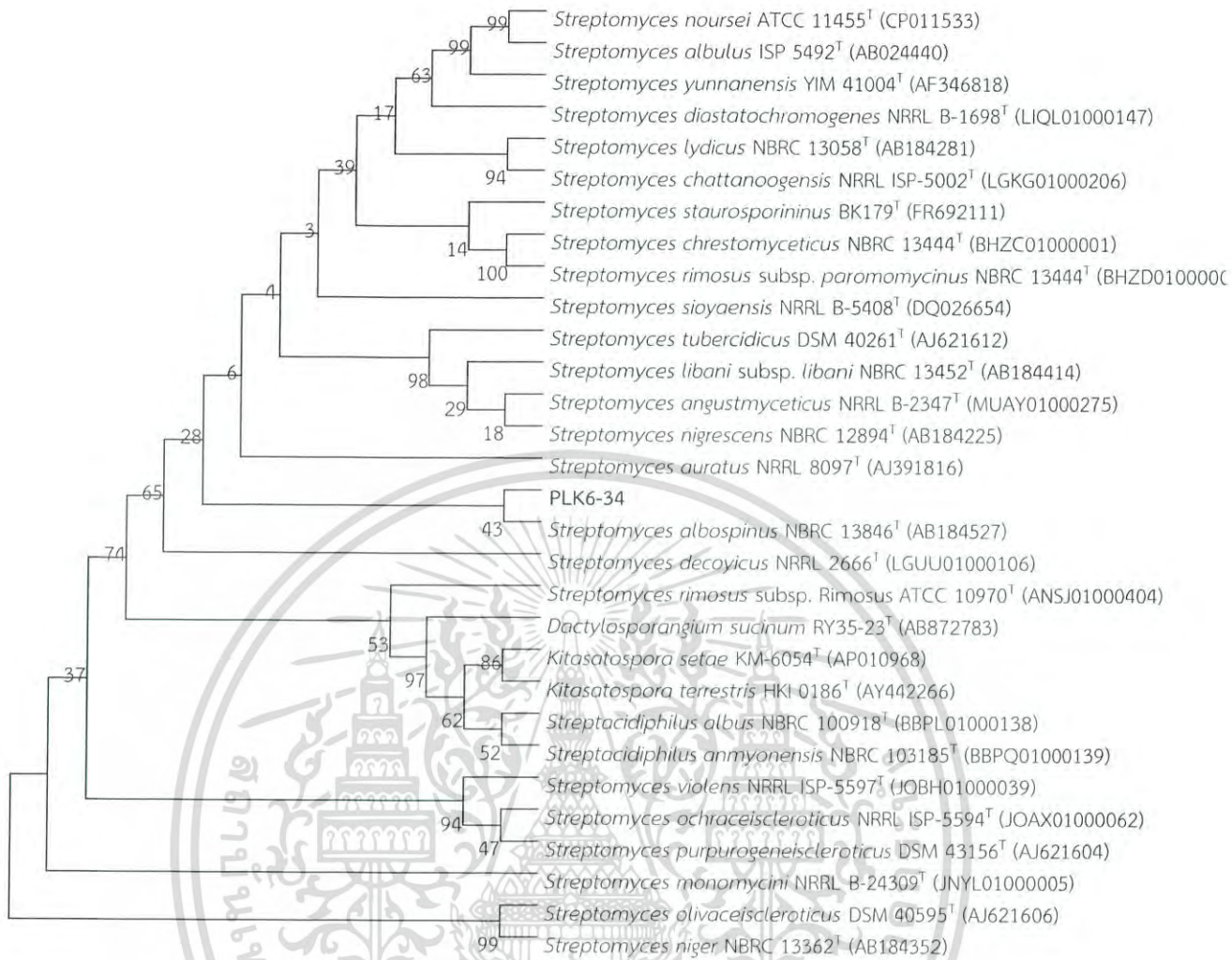
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK3-71 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK5-43 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



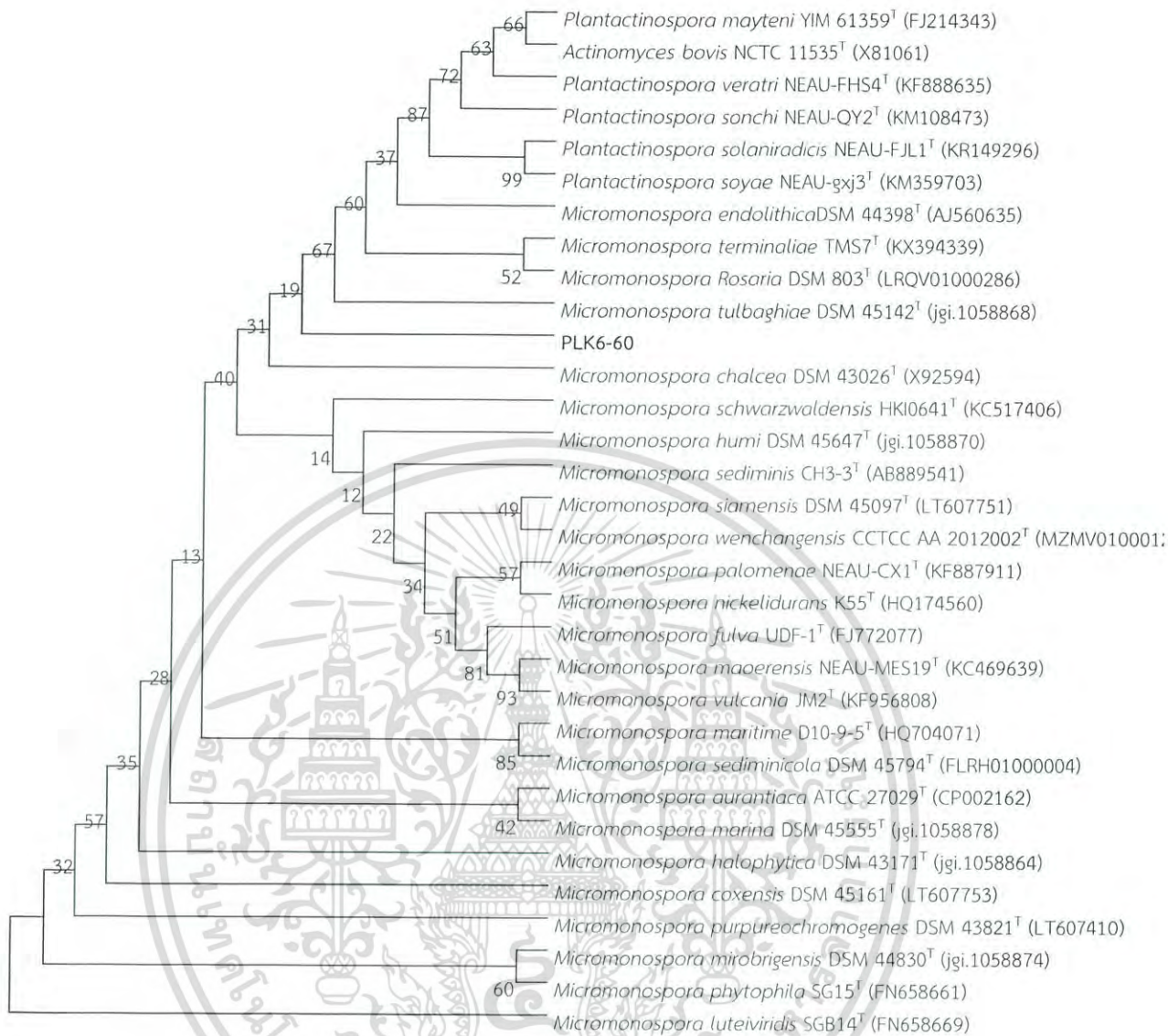
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-34 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



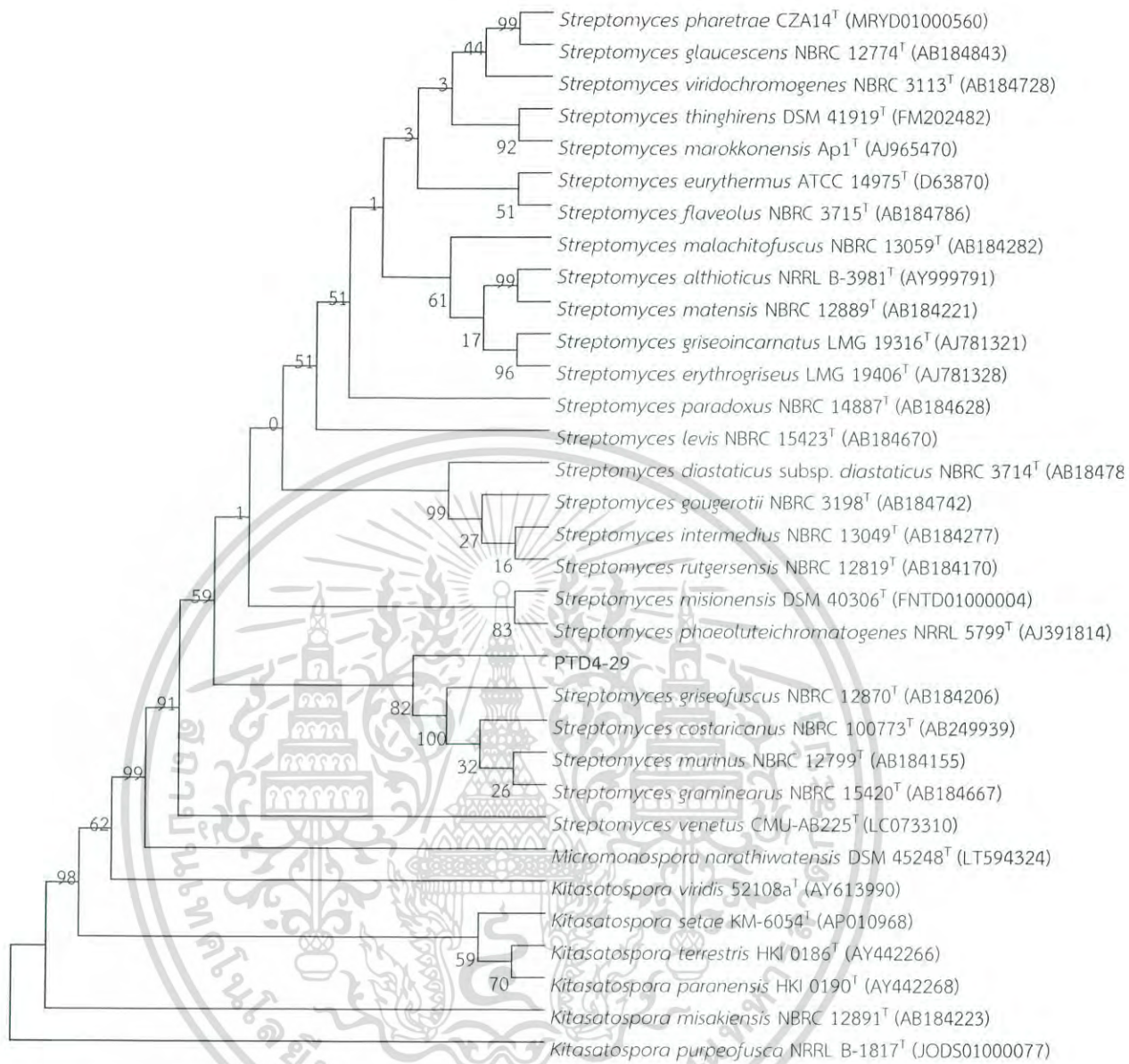
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-54 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



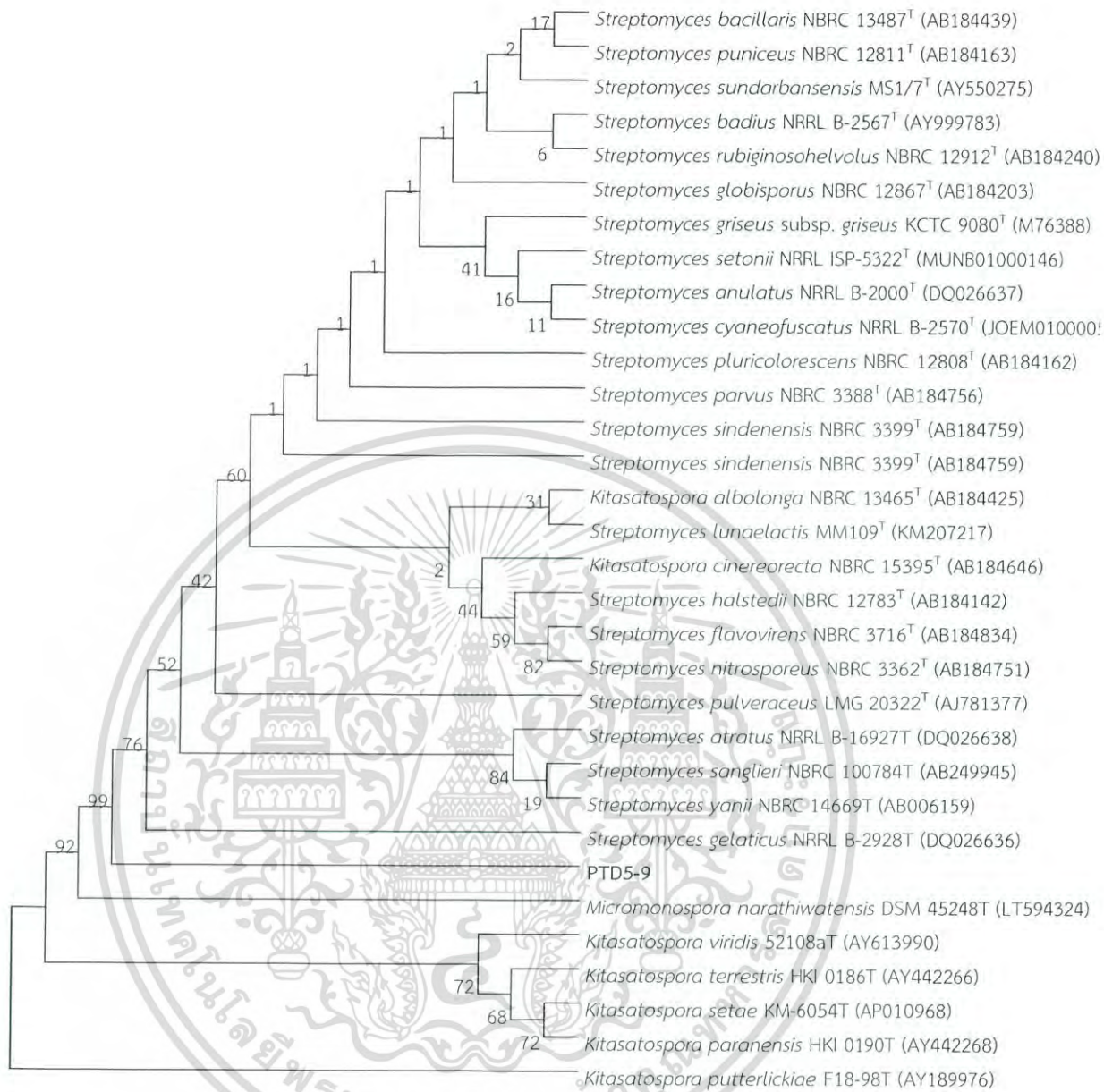
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PLK6-60 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



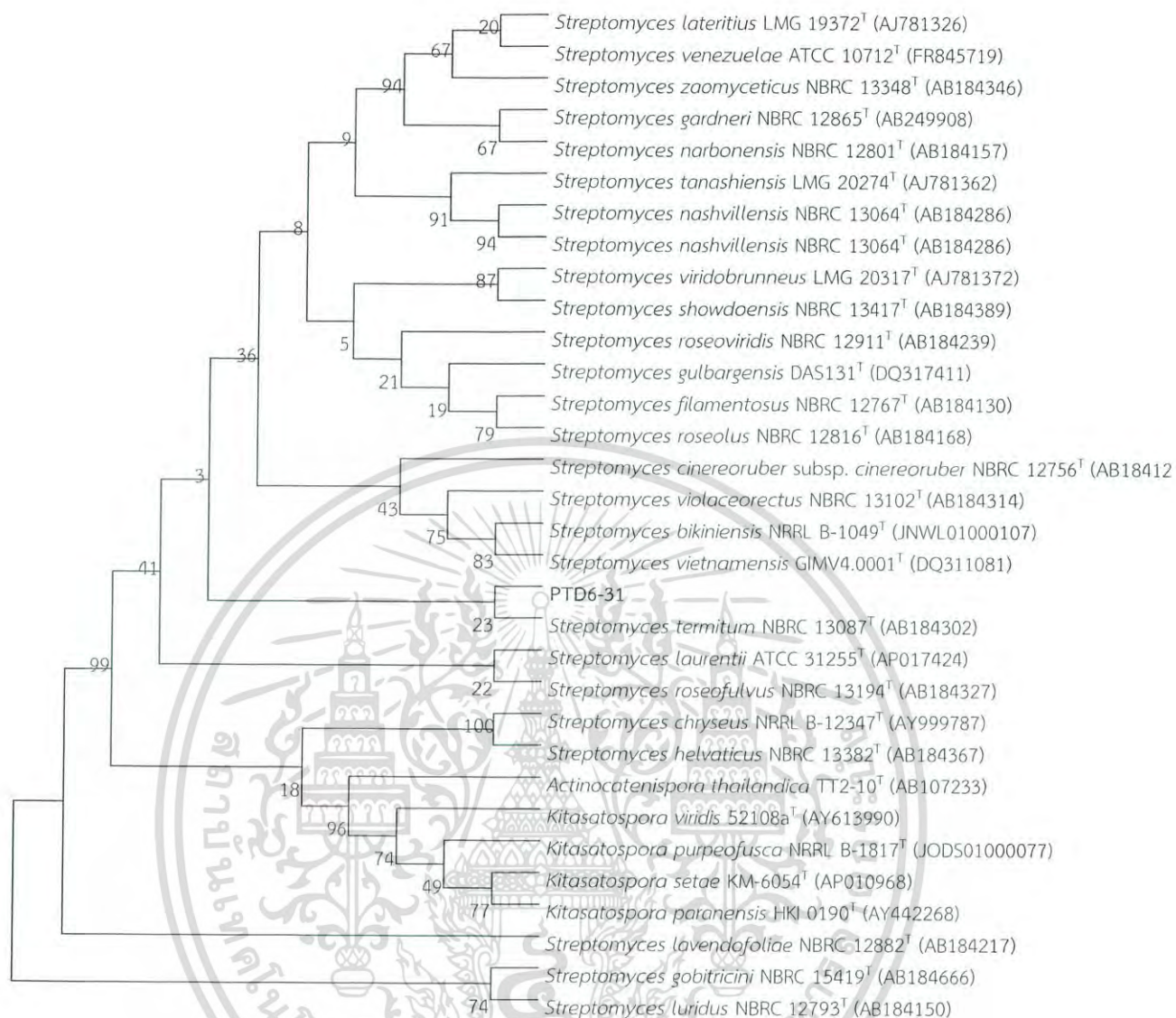
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD4-29 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



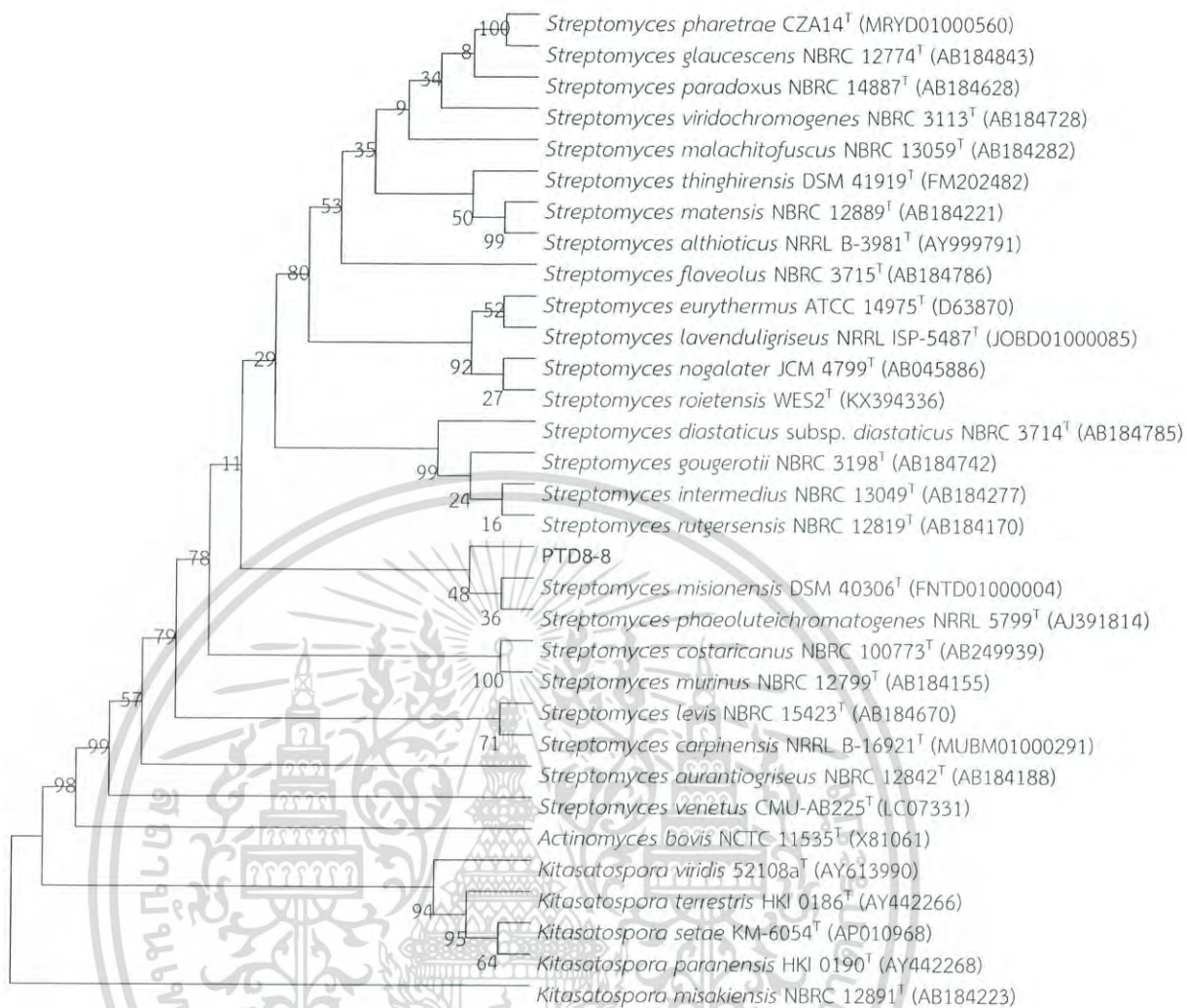
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD5-9 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



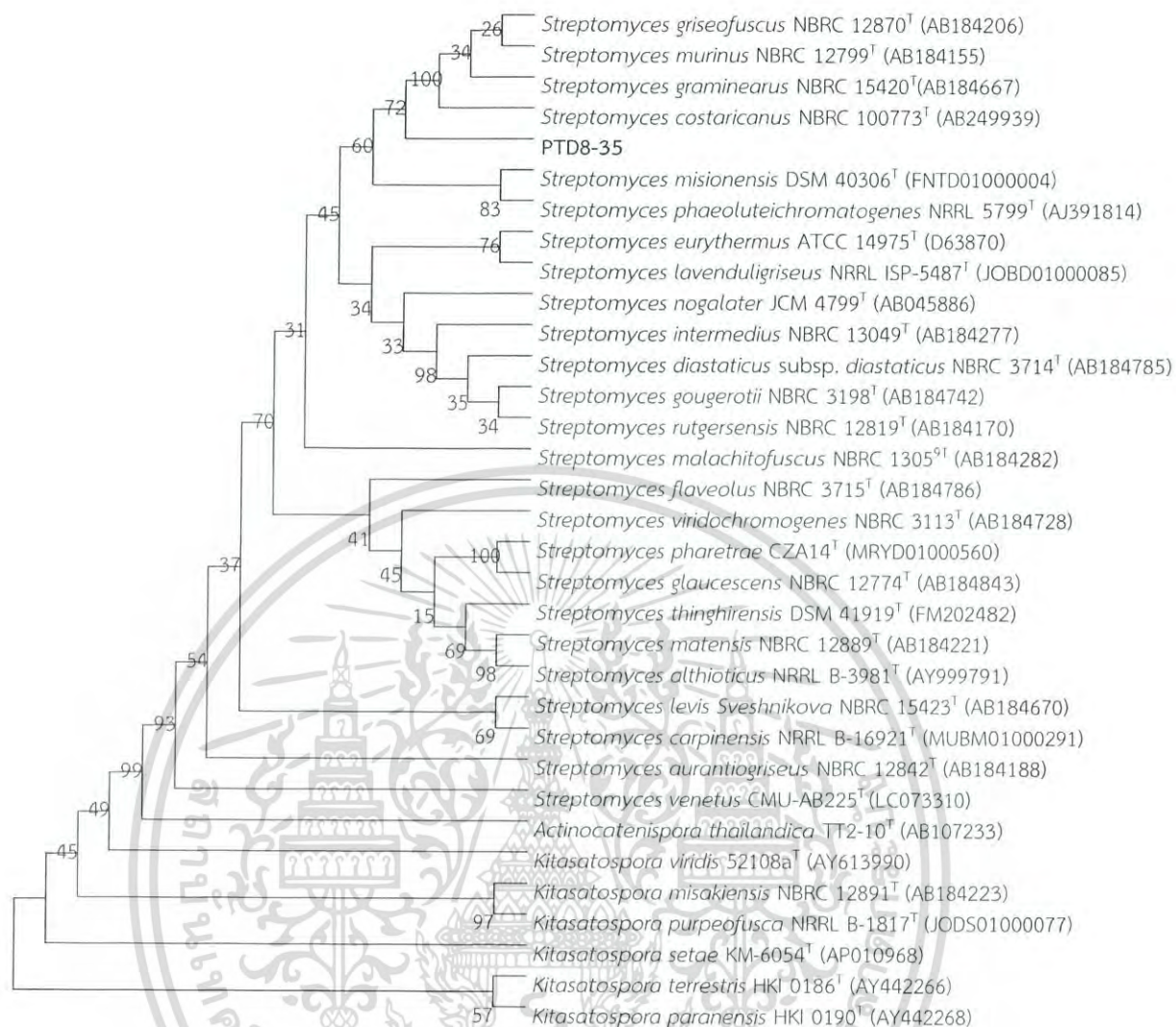
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD6-31 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



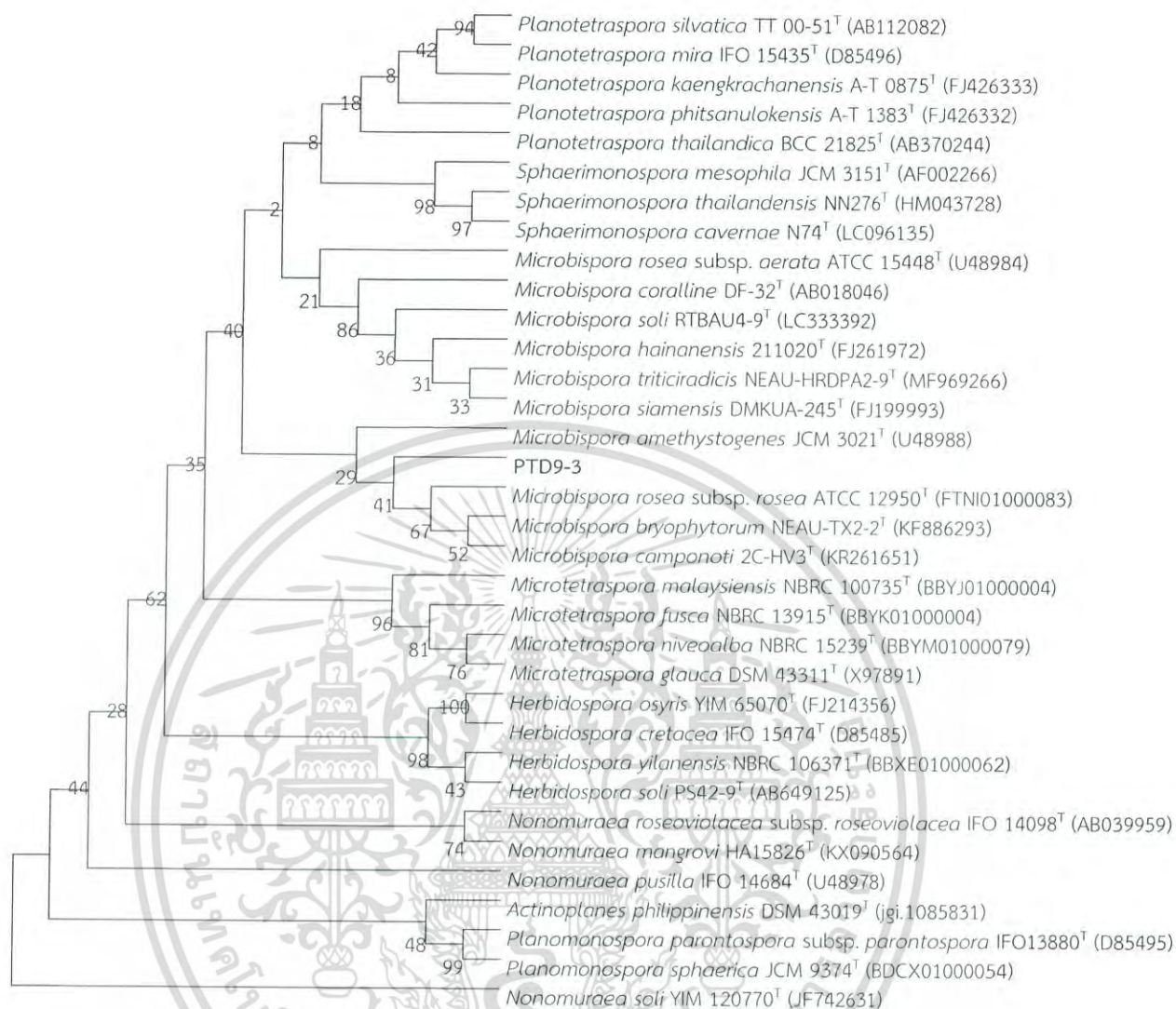
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-8 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



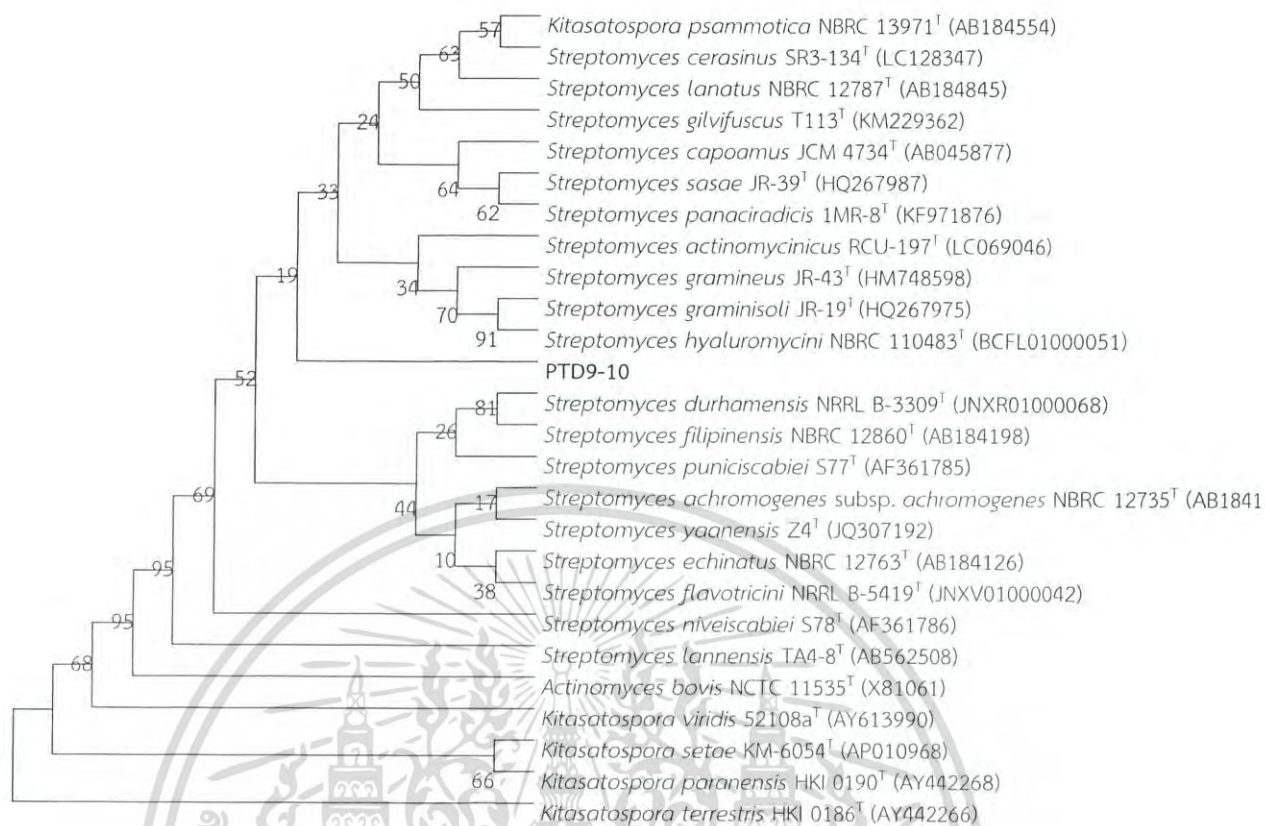
แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD8-35 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-3 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แสดงตำแหน่งของไอโซเลต PTD9-10 บน phylogenetic tree (maximum parsimony method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้