สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกและการตรวจสอบลักษณะเชื้อสกุลไมโครไบสปอราจากดินทางภาคตะวันตกของประเทศไทย

นายคมสันต์ สุป้อง

นางสาวพิมพ์ชนก กนกลาวัณย์

ปย.
ค1529ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83992
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b 11972825
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and characterization of *Microbispora* from soils in western area of Thailand

Mr. Khomsan Supongt

Ms. Pimchanok Kanoklawan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดแยกและการตรวจสอบลักษณะเชื้อสกุลไมโครไบสปอราจากดิน ทางภาคตะวันตกของประเทศไทย

นักศึกษา คมสันต์ สุป้อง รหัสนักศึกษา 47050113

พิมพ์ชนก กนกลาวัฒย์ รหัสนักศึกษา 47050146

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.จิตติ ท่าไว

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ดร. จิดาภา ทิน้อย	
กรรมการ ดร. จิดาภา ทิน้อย	
กรรมการ ดร. จิตติ ท่าไว	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	**การคัดแยกและการตรวจสอบลักษณะเชื้อสกุลไมโครไบสปอราจากดินทางภาคตะวันตกของประเทศไทย**
นักศึกษา	**คมสันต์ สุป้อง**
	พิมพ์ชนก กนกลาวัณย์
สาขาวิชา	**เทคโนโลยีชีวภาพ**
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์**
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	**ดร.จิตติ ท่าไว**

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ 20 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสปอร์คู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้นเกิดบนส่วนของเส้นใยอากาศ ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินร่วนที่ราบเชิงเขา และดินเหนียวบริเวณลุ่มแม่น้ำในจังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรีของประเทศไทย การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยทั่วไปของเชื้อไอโซเลตเหล่านี้ใช้วิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี สามารถแยกได้เป็น 15 กลุ่ม จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบอกได้ว่าเชื้อทั้งหมดนี้เป็นเชื้อในสกุล *Microbispora* และเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ 2 ไอโซเลตคือ KB2-1 และ RB20-4 ถูกเลือกมาเพื่อวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์ยีนในช่วง 16S rRNA gene ผลที่ได้พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้สามารถจัดจำแนกเป็นเชื้อในสกุล *Microbispora* ซึ่งเชื้อไอโซเลต KB2-1 อยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* (*M. parva*) ATCC 3332 (U48985) ที่ระดับร้อยละความคล้ายคลึง 99.20 และ RB20-4 อยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T ที่ระดับร้อยละความคล้ายคลึง 99.20 การตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นพบว่า เชื้อบางไอโซเลตสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title Isolation and characterization of *Microbispora* from soil in western area of Thailand.

Student Komson Supong

Pimchanok Kanoklawan

Program Biotechnology

Department Applied Biology

Academic Year 2007

Special Project Advisor Dr. Chitti Thawai

ABSTRACT

Twenty actinomycete strains, which produced longitudinal pairs of spores on their short sporophore of the aerial mycelia, were isolated from soil samples; plateau loose soil and river basin clay collected in Kanchanaburi and Ratchaburi of Thailand. The generic identifies of these isolates were determined by using a procedure that combined morphological, physiological and biochemical and could be devided to fifteen groups. Morphological characteristics of these strains coincided with those of the genus *Microbispora*. The two actinomycete strains, KB2-1 and RB20-4 were selected for phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences. The result also indicated that these strains should be classified in the genus *Microbispora*. The isolate KB2-1 formed a clade with *Microbispora rosea sub*sp. *aerata* (*M. aerata*) ATCC15448^T at similarity percentage of 99.20 and RB20-4 formed a clade with *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T at similarity percentage of 99.20. The preliminary test for antimicrobial activities revealed that some strains produced the secondary metabolites that inhibited the growth of tested microorganisms such as *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร. จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ให้สุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. จิดาภา ทินัอย อาจารย์ ศรีสุภาพ พูนลาภเดชา ประธานกรรมการ และกรรมการตามลำดับ ที่กรุณาสละเวลาตรวจทาน และพิจารณาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน

ขอขอบคุณพี่ๆ ปริญญาโท และพี่ๆนักวิชาการทุกท่าน ที่ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบใจเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ช่วยเหลือในระหว่างการดำเนินงาน และเป็นกำลังใจให้มาตลอด

นอกจากนี้ยังมีบิดา มารดา และผู้มีอุปการคุณที่กรุณาอบรมสั่งสอน และอุปการะผู้จัดทำให้ศึกษาจนสำเร็จได้ด้วยดี

คมสันต์ สุป้อง

พิมพ์ชนก กนกลาวัฒย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (Actinomycetes)	4
2.2 ลักษณะของเชื้อสกุล *Microbispora*	5
2.3 การแยกเชื้อ *Microbispora* จากดิน	10
2.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุล *Microbispora*	11
2.5 สารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora*	21
2.6 การศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ	23
2.7 ความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อสกุล	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26
3.1 อุปกรณ์	26
3.2 สารเคมี	26
3.3 วิธีการทดลอง	27
3.3.1 การเก็บตัวอย่างการแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ	27
3.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกได้	30
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	34
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	35
4.2.1 ลักษณทางฟีโนไทป์	35
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของยีนในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์วิวัฒนาการ	73
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น	76
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	78
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก ก	83
ภาคผนวก ข	90
ภาคผนวก ค	91
ภาคผนวก ง	95
ภาคผนวก จ	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงค่า DNA-DNA hybridization ของเชื้อไอโซเลตDF-28 และ DF-32^{T} (*Microbispora coralina*) เทียบกับเชื้อในสกุล *Microbispora*	8
2 แสดงแบบแผนของกรดอะมิโนของเชื้อแอคติมัยซีทส์	16
3 แสดงรูปแบบของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของแอคติโนมัยซีทส์	17
4 แสดงชนิดฟอสโฟลิปิดที่พบในแอคติโนมัยซีทส์	18
5 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากวิธีการแยกแต่ละชนิด	34
6 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	51
7 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแต่ละไอโซเลต	71
8 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแต่ละไอโซเลต	72
9 แสดงค่าระดับความคล้ายคลึงกันของไอโซเลต KB2-1 และ RB20-4 เทียบกับเชื้อ *Moicrobispora* สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด	74
10 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ	76
11 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง แหล่งที่มา วิธีการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุล *Microbispora* ที่มีลักษณะเป็นสปอร์คู่ บนก้านชูสปอร์ที่สั้น	6
2 แสดงสปอร์ของ *Microbispora rosea* เกิดจากสปอร์ต่อกันเป็นคู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น	12
3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะสปอร์	13
4 แสดงโครงสร้างของเปบทิโดไกลแคน	15
5 แสดงโครงสร้างหลักของ Menaquinone	18
6 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสกุล *Microbispora* ซึ่งจัดอยู่ในแฟมิลี่ *Streptosporangiaceae*	20
7 แสดงโครงสร้างสารแอสโทรมัยซิน ซึ่งเป็นปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแฟมิลี่ *Micromonosporaceae*	22
8 แสดงโครงสร้างสารโพรเพพตินที่ผลิตจากเชื้อ *Microbispora* sp.	22
9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Microbispora* sp. SNA-115 ที่สามารถสร้างสารโปรเปบติน	23
10 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB11-6 บนอาหาร ISP2	36
11 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต KB2-1 บนอาหาร ISP2	37
12 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต KB2-13 บนอาหาร ISP2	38
13 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB20-4 บนอาหาร ISP2	39
14 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB20-1บนอาหาร ISP2	40
15 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-14 บนอาหาร ISP2	41
16 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-9 บนอาหาร ISP2	42
17 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-12 บนอาหาร ISP2	43
18 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-13 บนอาหาร ISP2	44
19 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-16 บนอาหาร ISP2	45
20 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-35 บนอาหาร ISP2	46
21 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-2 บนอาหาร ISP2	47
22 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB11-19 บนอาหาร ISP2	48
23 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-22 บนอาหาร ISP2	49
24 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-15 บนอาหาร ISP2	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25 แสดงลักษณะ Phylogenetic tree ของเชื้อไอโซเลต KB2-1 และ RB20-4	75
26 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* 20 ไอโซเลต ต่างๆ บนอาหาร ISP2	95
27 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* 20 ไอโซเลต ต่างๆ บนอาหาร 1/5 ISP2	98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ในการศึกษาค้นคว้าสารปฏิชีวนะชนิดใหม่นั้นถือว่ามีความสำคัญมาก เนื่องจากในปัจจุบันมีเชื้อโรคหลายชนิดที่ดื้อยามากขึ้น และยาปฏิชีวนะบางชนิดที่เคยใช้รักษาโรค ก็เป็นพิษต่อเซลล์และมีผลข้างเคียงหลายประการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้ได้มาซึ่งสารปฏิชีวนะตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติดีกว่าเดิม สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างได้จากจุลินทรีย์หนึ่งในจำนวนนั้นคือเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ ซึ่งสามารถนำมาสกัดสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด (Okami และ Hotta , 1988) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส โดยเฉพาะเชื้อสกุล *Streptomyces* พบว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดถึงร้อยละ 80 ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ทั้งหมดจากเชื้อกลุ่มนี้ นอกเหนือจากนี้ยังพบได้จากเชื้อในสกุลอื่นเช่น *Micromonospora, Microbispora, Nocardia Streptoverticillium, Actinoplanes, Actinomadura, Streptosporangium, Saccharopolyspora, Dactylosporangium, Chainia, Nocardiopsis, Ampullariella, Amycolatopsis, Kitasatosporia, Pseudonocardia, Saccharothrix, Microtetraspora, Microellobosporia, Streptoalloteichus, Actinosporangium, Kibdelosporangium, Actinosynema, Planobispora, Planomonospora* และ *Saccharomonospora* (Oki, 1994)

เชื้อสกุล *Microbispora* เป็นสกุลหนึ่งที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ยังมีรายงานการค้นพบไม่มากนัก เนื่องจากเชื้อในสกุลนี้เป็นเชื้อที่หายาก เพราะการกระจายตัวของเชื้อในแหล่งดินมีน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อสกุลอื่นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ เช่นเชื้อในสกุล *Streptomyces* และ *Nocardia* เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการค้นพบว่าเชื้อสกุล *Microbispora* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีในระดับหนึ่ง ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกใหม่ในการค้นคว้าทดลองเพื่อให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อในสกุล *Microbispora* ที่มีฤทธิ์ดียิ่งขึ้น

งานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษา และรวบรวมข้อมูลของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อใช้ประกอบเป็นแนวทางในการศึกษาระดับต่อไป โดยเริ่มต้นจากการสำรวจแหล่งธรรมชาติที่ยังไม่ค่อยมีการเข้าไปศึกษามากนัก และมีสภาพธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติในภูมิภาคตะวันตกของประเทศไทย จังหวัดราชบุรี และจังหวัดกาญจนบุรีนี้ มีความอุดมสมบูรณ์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป่าไม้ และหุบเขาโดยภูมิประเทศที่เป็นภูเขาสลับซับซ้อนนี้เป็นแหล่งต้นกำเนิดของแม่น้ำ และน้ำตกในอีกหลายๆ สาย หุบเขาส่วนมากจะเป็นแนวยาวมีรอยเลื่อนซึ่งทรุดต่ำกลายเป็นช่องเขา บริเวณหุบเขามีร่องน้ำไหลผ่าน พื้นที่โดยทั่วไปค่อนข้างสมบูรณ์ จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อในสกุลนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานหรือใช้ประกอบการศึกษาด้านอื่นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* จากดินบริเวณภาคตะวันตกของประเทศไทย

2. เพื่อจัดจำแนกและตรวจสอบลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* ที่แยกได้เบื้องต้น

3. เพื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* จากแหล่งดินในเขตภาคตะวันตก ได้แก่จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดราชบุรี

2. ทำการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะสรีระวิทยา ชีวเคมีของเชื้อสกุล *Microbispora* และลักษณะทางจีโนไทป์ เช่นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนช่วง 16S rRNA gene

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถรวบรวมข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* ที่แยกได้ เพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการศึกษาระดับต่อไป

2. สามารถคัดแยก เชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้

3. การวิจัยในครั้งนี้อาจพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ใหม่และ/หรือสามารถสร้างสารทุติยภูมิ เพื่อนำมาใช้เป็นทัพยากรจุลินทรีย์ ในการวิจัย และการปฏิบัติงานต่อไป

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 นำดินมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* ตามวิธีเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก บนอาหารที่แตกต่างกัน

1.2 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อสกุล *Microbispora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.3 แยกเชื้อที่คัดเลือกได้ให้บริสุทธิ์ และเก็บสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้ไว้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

2. การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกได้

2.1 ตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์

2.1.1 ตรวจสอบลักษณะของการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1.2 ตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

2.2 ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วง 16S rRNA gene และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

3.1 นำเชื้อสกุล *Microbispora* ที่แยกเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

3.2 วัดระยะทางการยับยั้งและบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ (Actinomycetes) (งามนิจ, 2537ก)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อรา คือเซลล์มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใย เชื้อแอคติโนมัยซีทส์บางกลุ่มสร้างเส้นใยแตกกิ่งก้านและสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศได้เช่น คอนิดิโอสปอร์(Conidiospore) หรือโคนิเดีย (Conidia) ซึ่งเป็นสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่เกิดภายในถุงหุ้มจะเรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) โดยเกิดอยู่ในสปอร์แรงเจียม (Sporangium)

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่คล้ายคลึงกับพวกฟังไจอิมเพอร์เฟค (Fungi Imperfect) คือ เส้นใยของแอคติโนมัยซีทส์จะแตกสาขาคล้ายเส้นใยของเชื้อรา โดยมักจะสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) ซึ่งตรงปลายจะมีโคนิเดียคล้ายกับเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในอาหารเหลวไม่ค่อยจะปรากฏว่าทำให้เกิดสีขุ่น (Turbidity) อันเนื่องมาจากการแขวนลอยของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดียวเช่นแบคทีเรีย แต่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์จะเจริญแบบกลุ่มก้อน และมีการเพิ่มจำนวนคล้ายกับเชื้อรา (Apically) ส่วนการเพิ่มจำนวนของพวกแบคทีเรียจะเป็นแบบทวีคูณ (Exponential)

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย คือมีขนาด และรูปร่างใกล้เคียงกัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 1.2 ไมโครเมตร ส่วนที่ขาดออกเป็นท่อน ๆ (Fragment) จะมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium* และ Coryneform ไม่ว่าจะเป็นรูปร่าง การติดสีย้อมและลักษณะทางสรีระวิทยา ถูกทำลายได้โดยแบคเทอริโอฝาจ และสารปฏิชีวะนะประเภทเดียวกับที่ทำลายแบคทีเรีย ลักษณะของเซลล์จัดเป็นเซลล์ชั้นต่ำที่ยังไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Prokaryotes) ผนังเซลล์ไม่มีไคตินหรือเซลลูโลส แต่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Polymer) ของน้ำตาล กรดอะมิโน ซึ่งคล้ายกับผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria)

แอคติโนมัยซีทส์ เจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันพอสมควร คือ นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้วยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมาก ๆ ในโคลน แม่น้ำหรือได้ทะเลสาป แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร จากการนับจำนวนจากดินตัวอย่างที่ไม่มีการจำกัดการเจริญ พบว่ามีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นด่าง จะพบแอคติโนมัยซีทส์ในอัตราส่วนที่สูงขึ้น เช่น ดินที่มีค่าพีเอช 6.5 - 8 จะมีแอคติโนมัยซีทส์สูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินด่างทั่ว ๆ ไปจะพบประมาณร้อยละ 10 – 70 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด จากความสามารถในการทนความแห้งแล้ง

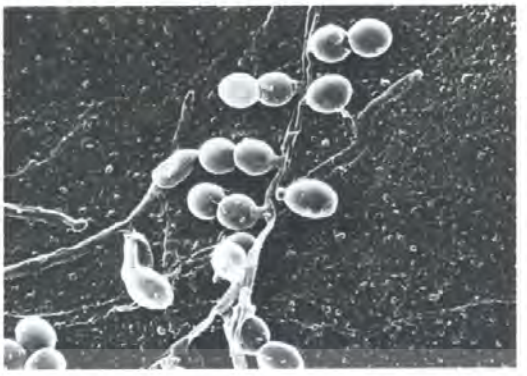
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดี ทำให้สภาพดินแห้งจะพบแอคติโนมัยซีทส์เป็นอัตราส่วนสูงขึ้น จึงมักพบในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น สภาพที่เหมาะแก่การเจริญของแอคติโมมัยซีทส์ได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อย และจะไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด ถึงแม้ว่าแอคติโนมัยซีทส์จะสร้างสปอร์ได้ แต่ลักษณะของสปอร์ของแอคติโนมัยซีทส์ไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้มากนัก ตัวอย่างเช่น มีการทดลองเพาะสปอร์ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ไม่พบเชื้อ แอคติโนมัยซีทส์เจริญเลย ทำให้สรุปว่าสปอร์แอคติโนมัยซีทส์สามารถทนความร้อนได้มากกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้สภาพธรรมชาติจึงไม่สามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ 2 ชนิดดังกล่าว แต่ทั้งนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทส์มีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายยาก จึงพบว่าการเจริญมักจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เจริญลดลงแล้ว จากสภาพดังกล่าวทำให้สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีทส์อยู่ในลักษณะที่ไม่ค่อยจะมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้ง และอุณภูมิสูง ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระเจริญบนอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อยผุพัง บางชนิดเป็นพาหะนำโรคแก่มนุษย์เช่น *Mycobacterium leprae* สาเหตุของโรคเรื้อน และ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุของโรควัณโรค แอคติโนมัยซีทส์อื่นๆเป็นพาหะนำโรคของสัตว์และพืช แต่แอคติโนมัยซีทส์ที่พบในดินส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตราย บางชนิดมีประโยชน์ เช่น แอคติโนมัยซีทส์ในจีนัส *Frankia* จะอยู่ร่วมกับพืช มีส่วนช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Coyne, 1999)

2.2 ลักษณะของเชื้อสกุล *Microbispora*

เชื้อสกุล *Microbispora* จัดอยู่ในแฟมิลี่ *Streptosporangiaceae* ซึ่งประกอบด้วยเชื้อสกุล *Actinocapospora Clavisporangium Herbidospora Microbispora Microtetraspora Nonomoraea Planobispora Planomonospora Planotetraspora Sphaerosporangium Streptosporangium Thermopolyspora Acrocarpospora* และ *Microbispora* ซึ่งเชื้อในสกุล *Microbispora* มีลักษณะที่ต่างออกไปจากเชื้อสกุลอื่นๆในแฟมิลีนี้คือ สามารถสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ สปอร์มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร (Nonomura, 1989) ดังรูปที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุล *Microbispora* ที่มีลักษณะเป็นสปอร์คู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น
(**ที่มา** : Hayakawa และคณะ, 1991)

เชื้อสกุล *Microbispora* ค้นพบครั้งแรกโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1957 โดยจัดว่าเป็นเชื้อในกลุ่มของแอคติโนมัยซีทส์ ซึ่งพิจารณาจากลักษณะลักษณะการสร้างสปอร์ เชื้อสกุล *Microbispora* สายพันธุ์แรกที่มีการค้นพบ นั่นคือ *Microbispora rosea* แยกได้จากตัวอย่างดินในสวน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 28-37 องศาเซลเซียส ในอาหาร GYM *Streptomyces* Medium Rolled Oats Mineral Medium และ Organic Medium ต่อมาได้ถูกเสนอให้เป็นกลุ่ม *Microbispora rosea* subsp. *rosea* เชื้อสกุลนี้ส่วนมากเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิห้องประมาณ 20-37 องศาเซลเซียส (Mesophilic) แต่มีบางสายพันธุ์เช่น *Microbispora thermodiastatica* และ *Microbispora thermorosea* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 50-60 องศาเซลเซียส (Thermophilic) (Hayakawa และคณะ, 1991)

ในปี 1957 Henssen ได้เสนอเชื้อ *Microbispora bispora* ขึ้น แต่จากการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในช่วง 16S rRNA gene (Wang และคณะ, 1996) แสดงให้เห็นว่า *Microbispora bispora* มีลำดับวิวัฒนาการที่ห่างไกลออกไปจากกลุ่มของ *Microbispora rosea* และกลุ่มอื่นๆ รวมถึงในแฟมิลี่ *Streptosporangiaceae* ดังนั้นจึงได้เสนอให้เปลี่ยนเป็นกลุ่มของ *Thermobispora* มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Thermobispora bispora*

Nonomura และ Ohara เสนอชื่อเชื้อ *Microbispora parva Microbispora chromogenes Microbispora amethystogenes* และ *Microbispora diastatica* ขึ้นในปี 1960 แต่เมื่อได้รับการศึกษาเพิ่มเติมโดยละเอียดอีกครั้ง กลับพบว่าเป็นไปตามลักษณะเดียวกันกับ *Microbispora rosea* subsp. *rosea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gerber และ Lechevalier ได้พบเชื้อ *Microbispora aerata* ในปี 1964 ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีบนอาหาร Rolled Oats Mineral Medium ต่อมาปี 1991 Miyadoh และคณะ ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ใหม่พร้อมกับเสนอให้เป็นเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *aerata*

ปี 1969 Nonomura และ Ohara ได้เสนอชื่อของ *Microbispora thermodiastatica* และ *Microbispora thermorosea* ขึ้นอีกครั้ง โดยจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* ต่อมาในปี 1971 ได้พบเชื้อ *Microbispora echinospora* และเมื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียดพบว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อในสกุล *Actinomadura* จึงเสนอให้เปลี่ยนเป็นเชื้อ *Actinomadura echinospora*

นอกจากนี้ ในจำนวนรายชื่อของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับการบันทึกไว้นั้น Sherman และคณะ (1980) ได้กล่าวไว้ว่ามีจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ 10 สายพันธุ์ที่จัดว่ามีลักษณะเป็นไปตามกลุ่มของเชื้อสกุล *Microbispora* เมื่อได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า สายพันธุ์ *Microbispora viridis* (Miyadoh และคณะ, 1985) *Microbispora karatakensis* และ *Microbispora indica* (Rao และคณะ, 1987) ควรได้รับการเสนอให้เป็นเชื้อแอคติมัยซีทส์สายพันธุ์ใหม่ ต่อมา Kroppensted และ Miyadoh ได้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของอนุกรมวิธานทางเคมีในปี 1990 และได้ทำการย้ายเชื้อ *Microbispora echinospora* และ *Microbispora viridis* ไปสู่อีกสกุลหนึ่งคือ สกุล *Actinomadura* ชื่อว่า *Actinomadura echinospora* และ *Actinomadura rugatobispora* ตามลำดับ (Nakajima และคณะ, 1999)

จากการศึกษา DNA-DNA hybridization โดย Miyadoh และคณะ (1990) ได้เสนอว่า ทั้ง 10 สายพันธุ์ได้แก่ *Microbispora amethylstogenes, Microbispora chromogenes, Microbispora diastatica, Microbispora indica, Microbispora karnatakensis, Microbispora mesophila, Microbispora parva, Microbispora thermodiastatica, Microbispora thermorosea* ยกเว้น *Microbispora bispora* สามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Microbispora rosea* ซึ่งประกอบไปด้วย 2 สับสปีชีส์คือ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* และ *Microbispora rosea* subsp. *areta*

Zhang และคณะ ในปี1998 ได้จัดกลุ่มเชื้อในสกุล *Thermomonospora* และเสนอให้ย้าย *Thermomonospora mesophila* มาอยู่ในสกุล *Microbispora* ชื่อว่า *Microbispora mesophila* เพราะเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสปอร์ที่ต่อกันเป็นคู่ เกิดขึ้นบนส่วนของเส้นใยอากาศได้

ในปี 1999 Nakajima และคณะ ได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สายพันธุ์ใหม่จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งอยู่ในเขตทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และลักษณะทางเคมีของเชื้อแต่ละไอโซเลตพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DF-28 และ DF-32^T มีลักษณะที่เป็นไปตามเชื้อในสกุล *Microbispora* แต่อย่างไรก็ตาม บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA gene พบลักษณะความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดจากกลุ่ม *Microbispora rosea* subsp. *aerata* และ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ดังนั้นจึงได้เสนอให้เชื้อไอโซเลตดังกล่าวนี้เป็นสายพันธุ์ใหม่ ชื่อว่า *Microbispora coralline* และได้ทำการศึกษา DNA-DNA hybridization ของเชื้อสกุล *Microbispora* ทั้งหมด จากข้อมูลนี้พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์มีระดับความคล้ายคลึงกัน (%Homology) ที่ค่อนข้างและยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างแน่ชัด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่า DNA-DNA hybridization ของเชื้อไอโซเลตDF-28 และ DF-32^T (*Microbispora coralina*) เทียบกับเชื้อในสกุล *Microbispora*

Organism		G + C content (mol%)	Percentage DNA complementarity with labelled DNA from:													
Current name and strain	Original name		DF-32^T	DF-28	JCM 3000^T	JCM 9971	JCM 3022	JCM 3023	JCM 9972	JCM 3024	JCM 3298	JCM 3076^T	JCM 3109	JCM 3111	JCM 3021	JCM 10022
Isolate																
DF-32^T		71-5	100	99	34	32	37	37	34	30	32	31	32	32	31	36
DF-28		71-2	93	100	32	31	35	36	32	30	31	31	32	32	32	36
M. rosea subsp. *rosea*																
JCM 3000^T	*M. rosea*	69-9	45	33	100	112	75	74	65	66	62	71	58	56	53	53
JCM 9971	*M. indica*	70-0	41	35	93	100	72	76	66	75	63	63	55	57	48	52
JCM 3022	*M. chromogena*	70-0	35	32	73	70	100	80	67	61	58	60	55	56	50	49
JCM 3023	*M. diastatica*	68-9	34	29	73	69	85	100	66	60	53	55	56	55	49	52
JCM 9972	*M. luteorubida*	70-4	36	32	70	65	77	78	100	61	60	63	56	57	52	53
JCM 3024	*M. purpea*	69-9	31	27	66	65	61	60	57	100	54	52	51	52	41	46
Microbispora sp. JCM 3298	"*M. rosea* subsp. *hottentotiae*"	70-2	41	30	64	61	61	63	58	51	100	69	57	54	55	54
M. rosea subsp. *aerata*																
JCM 3076^T	*M. aerata*	70-8	35	33	62	59	62	62	56	60	56	100	80	69	47	52
JCM 3109	*M. thermodiastatica*	70-3	32	31	58	56	60	58	55	55	55	79	100	69	46	50
JCM 3111	*M. thermorosea*	70-1	35	33	61	59	61	60	60	58	59	68	69	100	44	51
M. rosea subsp. *rosea* JCM 3021	*M. amethystogenes*	70-5	34	30	49	47	50	48	44	41	48	51	44	43	100	81
Microbispora sp. JCM 10022	"*M. amethystogenes* subsp. *tsinlingensis*"	70-2	32	29	47	44	51	50	46	43	46	46	44	43	71	100

เชื้อ *Microbispora coralline* (co. ral'li. Na. L. fem. Adj. coralline coral = coloured) มีสีของเส้นใยอาหารเป็นสีแดงอมชมพู จนถึงชมพูอมน้ำตาล สีของเส้นใยอากาศคือ สีชมพู และสามารถสร้างรงควัตถุบนอาหารสีเหลืองอ่อน ลักษณะของสปอร์เป็นสปอร์คู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้นและแตกกิ่งก้าน สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ผิวเรียบ มีค่าร้อยละโมลของ G+C เท่ากับ 71-72

ในขณะนี้สามารถสืบค้นข้อมูลของเชื้อสกุล *Microbispora* ได้โดยอ้างอิงจากฐานข้อมูลของศูนย์เก็บเชื้อในประเทศต่างๆเช่น เยอรมัน (DSMZ) (www.dsmz.de/microorganism/html/) หรือญี่ปุ่น (JCM) โดยได้กล่าวรายละเอียดของเชื้อดังกล่าวไว้ ดังนี้

Microbispora aerata ค้นพบโดย Gerber and Lechevalier ในปี 1964 และมีรายงานการค้นพบเชื้อดังกล่าวนี้อีกครั้งโดย Cross ในปี 1974 ซึ่งต่อมาได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็นเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microbispora rosea subsp. *Aerata* โดย Gerber and Lechevalier ปี 1964 และ Miyadoh และคณะ ในปี 1991

Microbispora amethystogenes ค้นพบโดย Nonomura and Ohara ในปี 1960 และต่อมาได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่ แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่แน่ชัดออกเผยแพร่ในขณะนี้ยังคงเป็นเชื้อ *Microbispora amethystogenes* subsp. *nonreducens*

Microbispora bispora ค้นพบโดย Henssen ในปี 1957 และมีรายงานการค้นพบเชื้อดังกล่าวนี้อีกครั้งโดย Lechevalier ในปี 1965 ซึ่งต่อมาได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็นเชื้อ *Thermobispora bispora* โดย Henssen และ Wang ในปี 1996

Microbispora chromogenes ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1960 และได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็นเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* โดย Nakajima และคณะ ในปี 1999

Microbispora diastatica ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1960

Microbispora echinospora ค้นพบโดย Nonomura and Ohara ในปี 1971 ซึ่งต่อมาได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็น *Actinomadura echinospora* โดย Nonomura Ohara และ Kroppenstedt และคณะในปี 1991

Microbispora griseoalba กำลังอยู่ในช่วงศึกษาทดลองจึงยังไม่มีผลรายงานการวิจัยที่แน่ชัดออกเผยแพร่ในขณะนี้

Microbispora mesophila ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ปี 1971 และมีรายงานการค้นพบเชื้อดังกล่าวนี้อีกครั้งโดย Zhang และคณะ 1998 ซึ่งเชื้อดังกล่าวนี้ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็นเชื้อ *Thermomonospora mesophila*

Microbispora parva ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1960

Microbispora rosea ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1957

Microbispora rosea subsp. *aerata* ค้นพบโดย Gerber และ Lechevalier 1991 ภายหลังได้พิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็นเชื้อที่มีลักษณะเช่นเดียวกับ *Microbispora aerata* โดย Gerber Lechevalier และ Cross ในปี 1974

ในปี1964 และมีรายงานการค้นพบเชื้อดังกล่าวนี้อีกครั้งโดย Miyadoh และคณะในปี *Microbispora rosea* subsp. *nonnitritogenes* กำลังอยู่ในช่วงศึกษาทดลองจึงยังไม่รายงานผลการวิจัยที่แน่ชัดออกเผยแพร่ในขณะนี้

Microbispora rosea subsp. *rosea* ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1957

Microbispora thermodiastatica ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1969

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microbispora thermorosea ค้นพบโดย Nonomura และ Ohara ในปี 1969

Microbispora viridis ค้นพบโดย Miyadoh และคณะในปี 1985 ภายหลังได้พิสูจน์เอกลักษณ์ใหม่เป็น *Actinomadura rugatobispora* โดย Miyadoh และคณะในปี 1991

2.3 การแยกเชื้อ *Microbispora* จากดิน

เชื้อสกุล *Microbispora* จัดเป็นเชื้อในกลุ่มของแอคติโนมัยซีทส์ซึ่งพบทั่วไปในดิน (Davies และ Williams, 1970) และมีวิธีการแยกเชื้อที่มีความจำเพาะกับแหล่งที่มาซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถเจริญได้มาก การแยกเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติมัยซีทส์จากตัวอย่างดินให้ได้เชื้อตามที่ต้องการนั้นจะต้องเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และการกระจายตัวของแบคทีเรียแกรมลบในอาหารที่ใช้แยก ซึ่งอาจทำได้โดยควบคุมองค์ประกอบของอาหารโดยการเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือในตัวอย่างดินก่อนที่จะนำมาแยกเชื้อ (Porter, 1971) องค์ประกอบของอาหารที่ต้องควบคุมเพื่อให้เชื้อแอคติมัยซีทส์สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง และกลีเซอรอล แหล่งไนโตรเจน เช่น เคซีน แอสปาราจีน และอาร์จีนีน เป็นต้น (El-Nakeeb และ Lechavalier, 1963)

การป้องกันและการลดจำนวนของเชื้อรา ทำได้โดยเติมสารยับยั้งการเจริญบางอย่างหรือสารปฏิชีวนะลงไป เช่น sodium propionate ร้อยละ 0.4 (Crook และคณะ, 1950) หรือ cycloheximide และ nystatin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น

Hayakawa และคณะ (1991) ได้แยกเชื้อ *Microbispora* และ *Micromonospora* จากตัวอย่างดินโดยใช้วิธี Dry heat phenol Chlorohexamide gluconate method สำหรับแยกเชื้อ *Microbispora* และใช้ Phenol-tunicamycin method สำหรับแยก *Micromonospora* การแยกเชื้อ *Microbispora* ทำได้โดยนำตัวอย่างดินที่ตากแห้งไปให้ความร้อนโดยการอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้ละลายในน้ำให้ได้ความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} แล้วดูดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์(Phosphate buffer) 5 มิลลิโมล พีเอช 7 ที่มีสารละลายฟีนอลร้อยละ 1.5 หรือใส่ในสารละลายคอลลิดินบัฟเฟอร์ (Collidine buffer) พีเอช 7 ที่ผสมคลอโรเฮกซาไมด์กลูโคเนต (Chlorohexamide gluconate, CG) ร้อยละ 0.03 หรือใส่ในสารละลายคอลลิดินบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมล พีเอช 7 ที่ผสมกับสารละลายฟีนอลร้อยละ 1.5 และ CG ร้อยละ 0.03 จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยคนสารละลายตลอดเวลา เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำสารละลายที่ได้เจือจางเป็น 1 : 10 หรือ 1 : 50 ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ และดูดสารละลายดังกล่าวมา 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar (HVA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ กรดนาลิไดซิก (Nalidisic acid) ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์ ส่วนวิธีในการแยก *Micromonospora* ทำได้โดยนำตัวอย่างดินร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อตัวอย่างดินแห้งแล้วนำมาละลายในน้ำให้ได้ความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นดูดมา 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ที่ผสมกับสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พร้อมกับคนส่วนผสมตลอดเวลา เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วดูดส่วนผสมที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำประปาที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} ดูดสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HVA ที่เติมสารปฏิชีวนะ ทูนิคามัยซิน (Tunicamycin) และ กรดนาลิไดซิก ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์

วิธีการแยกเชื้อโดยการใช้สารละลายฟีนอลเป็นการทำลายแบคทีเรียต่างๆ รวมถึง *Streptomyces* แต่ไม่มีผลต่อ *Microbispora* และ *Micromonospora* ส่วนการเติมสารปฏิชีวนะทูนิคามัยซิน จะส่งเสริมการเจริญของ *Micromonospora* และไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของ *Microbispora* ส่วนวิธีอบตัวอย่างดินด้วยความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จะช่วยลดจำนวนของแบคทีเรีย *Streptomyces* และ *Micromonospora* ส่วนการแยกด้วยสารละลายผสมของฟีนอล และคลอโรเฮกซาไมด์กลูโคเนตเป็นการกำจัดแอคติโนมัยซีทส์ที่ทนความร้อนได้โดยไม่มีผลต่อ *Microbispora* เช่นกัน ได้ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้จะสามารถคัดแยกจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหาร HVA ได้มากกว่าปกติถึงร้อยละ 90 (Hayakawa และคณะ, 1991)

2.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุล *Microbispora*

การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุล *Microbispora* นี้ แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

1. ลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics)

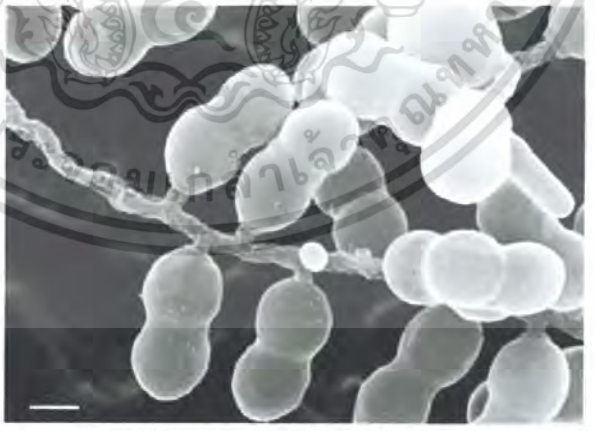
โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา(Morphological characteristics) ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี (Biochemical and Physiological characteristic) ของเชื้อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าโดยทั่วไปแล้วเชื้อแอคติโนมัยซีทส์มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา คือเซลล์เจริญเป็นเส้นสาย เส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้ 2 แบบคือ เซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใย (Fragmentation) และเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ในรูปของสปอร์ (Sporulation) ดังนั้นในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงเป็นการศึกษาในเรื่องของขนาด รูปร่าง โครงสร้างของเชื้อ โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กตรอนเพื่อตรวจสอบ รายละเอียดต่างๆ ของเซลล์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Microbispora* นี้มีความจำเพาะต่อการจัดจำแนก กล่าวคือสามารถใช้พิจารณาลักษณะการสร้างเส้นใย รูปแบบการสร้างสปอร์ และชนิดของสปอร์ที่สร้างภายในเซลล์ ซึ่งลักษณะโดยรวมของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์พบว่าเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารแข็งจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ โดยส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย Apical region และ Intercaly region ซึ่งจะมีสีที่แตกต่างกัน เช่น เหลือง ส้ม แดง ม่วง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล และสีดำ ลักษณะผิวของโคโลนีมีทั้งชนิดผิวเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวมๆ ลักษณะของสปอร์เป็นสปอร์เดียว หรือมีลักษณะเป็นสายยาว เกิดขึ้นบนส่วนของก้านชูสปอร์ (Sporophore) ก้านชูสปอร์ที่พบอาจเกิดขึ้นบนส่วนของเส้นใยอาหารหรือเกิดบนส่วนของเส้นใยอากาศ และก้านชูสปอร์ที่เชื้อแต่ละชนิดสร้างมีทั้งที่แตกกิ่งก้านหรือเป็นก้านชูอันเดียว ลักษณะสปอร์ที่ต่อกันส่วนใหญ่จะสามารถใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาในการจัดจำแนกเชื้อ โดยตรวจสอบจากความยาวและ/หรือจำนวนสปอร์

สำหรับเชื้อสกุล *Microbispora* นั้นสามารถสร้างสปอร์ที่ลักษณะเฉพาะคือ สร้างโคนิดิโอ-สปอร์ (Conidiospore) ที่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร (Nonomuura,1989) ดังรูปที่ 2 จากการศึกษาลักษณะสปอร์ที่ต่อกันเป็นคู่นี้ใช้เป็นลักษณะจำเพาะของเชื้อในสกุล *Microbispora* ถึงแม้ว่ายังมีเชื้อสกุลอื่นที่สามารถสร้างสปอร์ในลักษณะนี้ก็ตาม เช่น *Actinomadura echinospora* และ *Actinomadura rugatobispora* แต่ลักษณะของสปอร์ก็จะมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดถึงบริเวณรอยคอดของสปอร์ ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงสปอร์ของ *Microbispora rosea* เกิดจากสปอร์ต่อกันเป็นคู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น (**ที่มา** : Hayakawa และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะสปอร์ของ (ก) *Actinomadura rugatobispora* (ข) *Planobispora rosea* (ค) *Microtetraspora roseola* และ (ง) *Herbidospora cretacea*
(ที่มา : (ก) Jiang และคณะ, 1991 (ข) Vobis, 1986 (ค) Miyadoh และคณะ, 1990 (ง) Shomura และคณะ, 1985)

ลักษณะการเจริญของเชื้อสามารถดูได้จากรูปแบบของการเจริญบนอาหาร International Streptomyces Project (ISP) ได้แก่ ISP 2 (Yeast extract–malt extract agar) ISP3 (Oatmeal agar) ISP 4 (Inorganic salts–starch agar) (Shirling และ Gottlieb, 1966) และอาหาร OYG (Oatmeal–yeast extract-glycerol) (Nonomura, 1989)

ลักษณะทางชีวเคมี และสรีระวิทยา การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี และสรีระวิทยาเช่น ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตต่างๆ การเจริญที่สภาพแวดล้อมซึ่งมี อุณหภูมิ และพีเอชที่ต่างกัน ความสามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ การสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และเม็ดสีเมลานอยด์ (Melanoid pigment) ตลอดจนการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่นเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทส (Nitrate reductase) และทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน ย่อยสลายแป้งเป็นต้น เชื้อบางชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางชนิดเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีสารอินทรีย์ แต่เชื้อบางชนิดต้องการสารอินทรีย์หลายชนิดในเวลาเดียวกัน เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล วิตามิน โคเอนไซม์ หรือแอคติโนมัยซีทส์ เป็นต้น

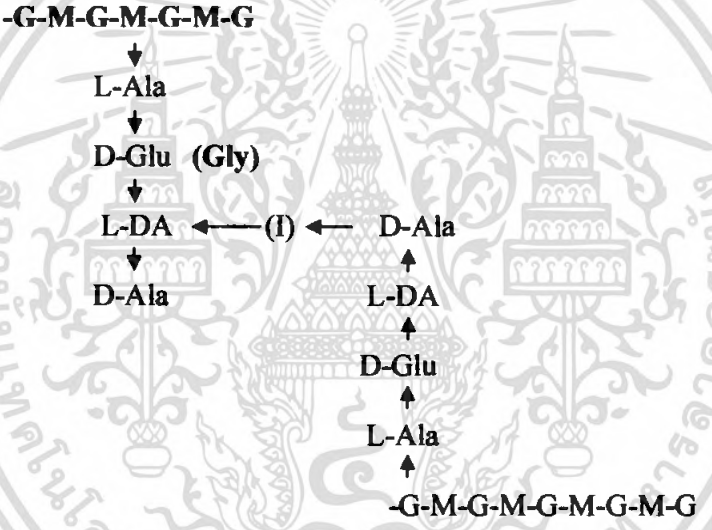
ลักษณะการเจริญของเชื้อสกุล *Microbispora* พบว่าส่วนใหญ่เชื้อในสกุลนี้เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 17 ถึง 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นในกลุ่มของ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อในสกุล *Microbispora* บางสายพันธุ์ยังสามารถย่อยสลายเคซีน (Casein) และ เอสคูลิน (Aesculin) ได้แต่ไม่สามารถสลาย อะดีนีน (Adenine) อิลาสติน (Elastin) กัวนีน (Guanine) ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เจลาติน (Keratin) เทสโตสเทอโรน (Testosterone) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) แซนทีน (Xanthine) ไซแลน (Xylan) หรือดีเอ็นเอ ส่วนการใช้สารประกอบคาร์บอนพบว่าส่วนใหญ่แล้วเชื้อสกุล *Microbispora* สามารถใช้ อะมิกดาลิน (Amygdalin) แอล-อะราบีโนส (L-arabinose) อาร์บูติล (Arbutin) ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) ดี-ฟรุกโตส (D-fructose) ดี-กาแลกโตส (D-galactose) ดี-กลูโคส (D-glucose) กลีเซอรอล (Glycerol) มัยโอ-อิโนซิทอล (*Myo*-inositol) ดี-แลกโตส (D-lactose) มอลโตส (Maltose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-เมเลซีโทส (D-melezitose) ดี-เมลิไบโอส(D-melibiose) เมทิล แอลฟา ดี-ไกลโคไซด์ (Methyl *a*-d-glucoside) ดี-ไรโบส (D-ribose) ซาลิซิน (Salicin) ดี-ซอบิทอล (D-sorbitol) แอล-ซอโบส (L-sorbose) สตาร์ท (Starch) ซูโครส(Sucrose) ดี-ทีฮาโลส (D-trehalose) และดี-ไซโลส (D-xylose) แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้เช่น อะโดนิทอล (Adonitol) ดี-อะราบิทอล (D-arabitol) ดูซิทอล (Dulcitol) ไอโซ-อิริทริทอล (Iso-erythritol) อินูลิน (Inulin) ดี-ราฟฟีโนส (D-raffinose) แอล-แรมโนส (L-rhamnose) หรือไซลิทอล (Xylitol) สำหรับกรดอินทรีย์ที่เชื้อส่วนใหญ่ในสกุลนี้สามารถใช้ได้คือ กรดฟูราริก (Fumaric acid) และกรดซักซินิก (Succinic acid) แต่ไม่สามารถใช้กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดมูซิก (Mucic acid) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) หรือ กรดตราตาริก (L-tartaric acid) ในการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้เชื้อ *Microbispora* หลายสายพันธ์สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง และเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* และ *Microbispora rosea* subsp. *aerate* ยังสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรได้ และทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้สูงสุดที่ร้อยละ 3 (Nakajima และคณะ, 1999)

2. ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics)

การศึกษาอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อได้แก่ การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall) ซึ่งผนังเซลล์ทำหน้าที่ที่สำคัญคือ ทำให้แบคทีเรียสามารถคงรูปร่างอยู่ได้ และที่สำคัญคือช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตก อันเนื่องจากความแตกต่างของแรงดันออสโมซีส ระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์จะพบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยสารอินทรีย์แตกต่างกัน เช่น ลิโพโพลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์จัดเป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มี องค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกนั้น จะดูจากชนิดของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ โดยวิเคราะห์ที่รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมิลิก (Diaminopimelic acid isomer) ที่เป็นองค์ประกอบของเปบทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ในผนังเซลล์ ดังรูปที่ 4 พบว่าชั้นนี้จะประกอบด้วยเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน(*N*-acetylglucosamine) และกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิก(*N*-acetyl (glycolylmuramic acid) เกาะเรียงกันเป็นสายยาวสลับกันไป และตรงบริเวณกรดเอ็น-อะซิติลมิวลามิกจะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน กรดอะมิโนนี้จะไปเชื่อมกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซิติลมิวลามิกอีกโมเลกุลหนึ่งโดยอาศัยพันธะเพปไทด์เป็นตัวเชื่อม จึงเรียกว่า อินเตอร์เพปไทด์บริดจ์ (Interpeptide bridge) และแบบแผนของกรดอะมิโน ดังตารางที่ 2



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของเปบทิโดไกลแคน

คำย่อ : G, *N*-acetylglucosamine; M, *N*-acetyl(glycolyl)muramic acid Ala, Alanine; Glu, Glutamic acid; Gly, glycerine; *L*-DA, *L*-diamino acid; I, interpeptide bridge.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงแบบแผนของกรดอะมิโนของเชื้อแอคติมัยซีทส์

องค์ประกอบของเพปติโดไกลแคน	แบบแผนของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์			
	I	II	III	IV
- ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมีลิก	*LL*	*Meso*	*Meso*	*Meso*
- ไกลซีนเชื่อมระหว่างเตตราเพปไทด์	+	+	-	-

LL คือ ผนังเซลล์มีไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนชนิดแอลไดอะมิโนพิมิลิก (*L,L*-diaminopimelic acid) Meso คือ ผนังเซลล์มีไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนชนิดมีโซไดอะมิโนพิมิลิก (*meso*-diamino-pimeric acid) + แสดงการตรวจพบ - แสดงการตรวจไม่พบ

(ที่มา : นงลักษณ์, 2547)

เมื่อพิจารณาลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในส่วนของผนังเซลล์แล้ว สามารถจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั่วไป (Common actinomycetes) พบในกลุ่ม *Streptomyceae* ได้แก่สกุล *Streptomyces* ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ LL-Diaminopimelic acid และเชื้ออีกกลุ่มคือเชื้อแอคติโนมัย-ซีทส์ที่ไม่ใช่ *Streptomyces* หรือแอคติโนมัยซีทส์หายาก (Rare actinomycetes) (Non-*Streptomyces*) ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์แบบ *Meso*-Diaminopimelic acid ได้แก่เชื้อสกุลอื่นทั้งหมดที่ไม่ใช่ *Streptomyces* รวมถึงเชื้อในสกุล *Microbispora* ด้วย นอกจากนี้ตรงตำแหน่งของกรดไออะมิโนพิเมลิกอาจถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนไลซีน ซึ่งพบในสกุล *Catellatospora* และ *Chouchioplanes*

เชื้อสกุล *Microbispora* สายพันธุ์ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* จะพบเพปติโดไกล-แคนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamic acid) อะลานีน (Alanine) และ A_2pm ในอัตรส่วนเชิงชั้ว 1.0: 1.3: 0.9 (คำนวณจากปริมาณกรดกลูตามิก 1.0) ไอโซเมอร์ของ A_2pm เป็นแบบ *Meso*- form เปบทิโดไกลแคนเป็นแบบ A_1gramma (Schleifer และ Kandler, 1972) ลักษณะของผนังเซลล์เป็นแบบ Type III (Lechevalier และ Lechevalier, 1970) หมู่ *N*-acetyl ของกรดกลูตามิกในเปบทิโดไกลแคนเป็นหมู่อะซิทิล (Acetyl type)

การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (Whole cell hydrolysate) จัดเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาลักษณะเคไมไทป์ของผนังเซลล์ (Cell wall chemotypes) อีกกรณีหนึ่ง โดยน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จะมีรูปแบบของน้ำตาล (Sugar pattern) ในเชื้อแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3 เช่น *Micromonospora* *Actinoplanes* *Dactylosporangium* มีน้ำตาลที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอกลักษณ์ได้แก่ ไซโลส (Xylose) และอะราบิโนส (Arabinose) ส่วนน้ำตาล มาดูโรส (Madurose) จะพบในเชื้อสกุล *Actinomadura* *Microbispora* *Microtetraspora* *Streptosporangium* *Planobispora* และสกุล *Planomonospora* น้ำตาลอะราบิโนสและกาแลกโตก (Galactose) จัดเป็นน้ำตาลที่เป็นเอกลักษณ์ของ *Saccharopolyspora* *Amycolatopsis* ส่วนเชื้อ *Thermomonospora* *Actinosynemata* และ *Nocardiopsis* ไม่พบน้ำตาลที่เป็นเอกลักษณ์ภายในเซลล์เหมือนกับเชื้อสกุลอื่น

เชื้อสกุล *Microbispora* สายพันธุ์ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* จะพบองค์ประกอบของน้ำตาลภายในเซลล์เป็นกลูโคส แมนโนส ไรโบส และมาดูโลส (Madulose) ในปริมาณน้อย หรือ 3-*O*-methyl-D-galactose น้ำตาลที่เป็นเอกลักษณ์ภายในเซลล์แบบบี (Pattern B) จะไม่พบน้ำตาลกาแลกโตส อะราบีโนส ไซโลส และแรมโนส (Lechevalier และ Lechevalier, 1970)

ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของแอคติโนมัยซีทส์

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

*Madurose หรือ *3-O*-methyl-D-galactose.

+ แสดงถึงการพบน้ำตาลชนิดนั้นๆ ในเซลล์

- แสดงถึงการไม่พบน้ำตาลชนิดนั้นๆ ในเซลล์

นอกจากนี้คุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของชื้อยังประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ ซึ่งอาจเป็นกรดไขมันที่มีกิ่งก้านหรือกรดไขมันอิ่มตัวรวมถึงชนิดของ ฟอสโฟลิปิด ดังตารางที่ 4

ในสกุลของ *Microbispora* สายพันธุ์ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* จะพบชนิดฟอสโฟลิปิดภายในเซลล์แบบฟอสฟาทิดิลอีทาโนลามีน (Phodphatidylethanolamine) และไนไฮดริน (Ninihydrin-positive) ไกลโคฟอสโฟลิพิด (Glycophospholipids) ซึ่งจัดเป็นฟอสโฟลิพิดชนิดที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83992

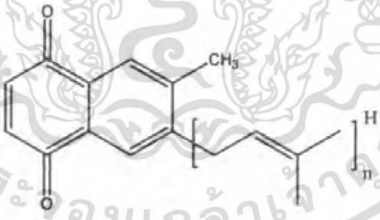
(Phospholipid pattern type PIV) (Lechevalier และคณะ, 1977) โดยกรดไขมันอิ่มตัว (Fatty acid composition) มีองค์ประกอบเป็นชนิด Normal fatty acid Iso fatty acid Anteiso fatty acid และ 10-Methyl fatty acid (Nakajima และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4 แสดงชนิดฟอสโฟลิปิดที่พบในแอคติโนมัยซีทส์

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

ND ไม่รายงานผล vไม่แน่นอน +พบ -ไม่พบ

รูปแบบของมีนาควิโนน (Menaquinone) ดังรูปที่ 5 ซึ่งมีนาควิโนนเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของเซลล์ โดยพบว่าเชื้อสกุล *Microbispora* สายพันธุ์ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ประกอบด้วยมีนาควิโนนชนิด MK-9 (III,VIII-H_4), MK-9(H_2) and MK-9(H_0)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างหลักของ Menaquinone

(ที่มา : www.cyberlipid.org/vitk/vitk0001.htm)

3. การศึกษาลักษณะจีโนไทป์ (Genotypic characteristics)

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ นิยมตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rRNA gene ซึ่งเป็นยีนที่มีเพียงชุดเดียวของจีโนมของแบคทีเรีย พบในแบคทีเรียทุกชนิดและในแอคติโนมัยซีทส์ยีนช่วงนี้มีขนาดประมาณ 1500 เบส ซึ่ง 16S rRNA gene เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ที่ดีในการใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นยีนที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การอนุรักษ์ (Conserve gene) มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตโดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวาง พบได้ทั่วไปและมีการอนุรักษ์ปานกลาง นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (เจษฎา, 2550) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene การตรวจสอบยีนนี้มี 2 วิธีคือ PCR-RFLP และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการโคลนยีนด้วยไพรเมอร์ (Primer) จำเพาะจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 เบส จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นที่ตัดด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซีส และโปรแกรมตรวจวิเคราะห์หรือการนำชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสแล้วตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีน โดยใช้ Software สำหรับการตรวจวิเคราะห์ เช่น GCG Wisconsin Package, Gene Explorer หรือโปรแกรมที่ให้บริการผ่านทางอินเตอร์เน็ต เป็นต้น ก็จะสามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียที่เราต้องการตรวจสอบเป็นชนิดใด

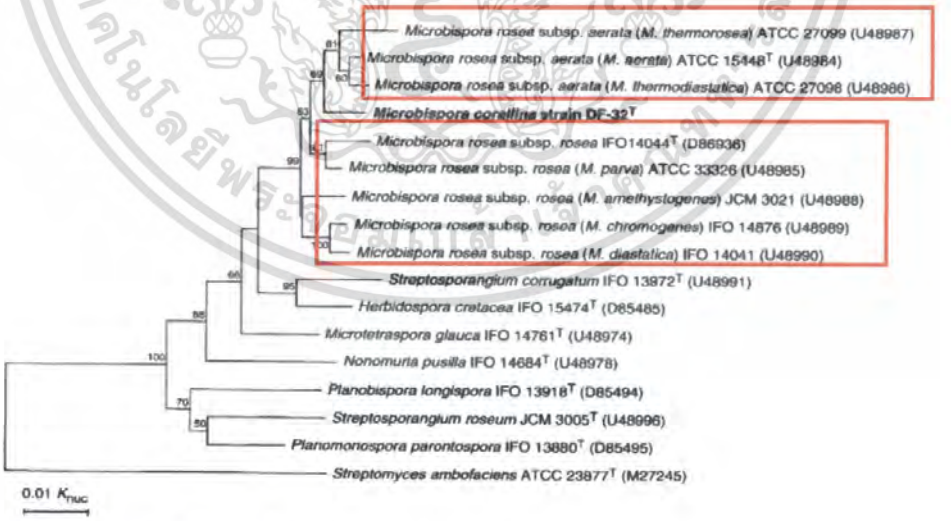
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA gene โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการออกแบบไพร-เมอร์ สามารถทำได้โดยหาช่วงยีน16S rRNA gene ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank คัดลอกลำดับเบสของยีนนี้ของเชื้อที่เราต้องการตรวจสอบ (Genetics computer group, 1999)โดยใช้เฉพาะส่วนที่เป็นลำดับเบสเก็บไว้ในข้อมูลอักษร (Notepad) จากนั้นใช้โปรแกรม Prime ใน GCG Wisconsin package ในการช่วยออกแบบไพรเมอร์ จะได้ไพรเมอร์ ต่างๆ หลายคู่ให้เลือกใช้ตามความต้องการ นำไพรเมอร์ที่ได้มาทดสอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ถ้าไพรเมอร์ ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงจะได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีนนี้เพียง 1 แถบ (เนื่องจากในยีโนมิกของแบคทีเรียมี 16S rRNA gene เพียงชุดเดียว) ขั้นตอนที่สำคัญคือ การใส่เงื่อนไขต่างๆ ในช่วงก่อนการออกแบบไพรเมอร์ ยีนนี้มีความยาวประมาณ 1500 เบส จึงควรกำหนดความยาวของผลผลิตพีซีอาร์ที่จะได้ไม่ต่ำกว่า 1500 เบส และเพิ่มความจำเพาะของชิ้นส่วนที่จะได้โดยการใช้ ไพรเมอร์ ที่มีค่า Tm สูง ความยาวของไพรเมอร์ ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 18-30 เบส ทดสอบไพรเมอร์หลายๆ ชุด (คู่) และเลือกชุดที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนั้นๆ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอ (ผลผลิตของพีซีอาร์) จะมีความชัดเจน ควรมีเพียงแถบเดียว (การมีแถบดีเอ็นเออื่นๆ ขึ้นมาแม้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าและมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม ก็จะมีผลเสียมากในขั้นตอนการหาลำดับเบสของยีน โดยจะทำให้การแยกยีนให้บริสุทธิ์ได้ยาก)

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อได้ไพรเมอร์ ที่เหมาะสมจากการทดสอบแล้ว จึงเริ่มการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบต่อไป แต่อย่างไรก็ตามอาจทดสอบไพรเมอร์ไปพร้อมๆ กับการโคลนยีนได้ ซึ่งมีหลายๆ วิธีในการกำหนดเงื่อนไขของพีซีอาร์ (PCR Protocol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้ ได้แก่ ยีนในช่วง 16S rRNA gene ซึ่งควรจะมีประมาณ 1500-1600 เบส นำขนาดผลผลิตที่ได้ไปหาลำดับเบสต่อไป ซึ่งในการหาลำดับเบสสามารถทำได้โดยวิธี Automated DNA Sequence คือ การหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งเป็นการพัฒนาอย่างมากของเทคโนโลยีนี้ มีหลักการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต อาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA Polymerase ในการสร้างดีเอ็นเอ สายใหม่ที่มีเบสคู่สม (Complementary base) กับดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วใช้นิวคลีโอไทด์ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเทคนิค พีซีอาร์ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยวิธี Cycle Sequencing ซึ่งจะต้องใช้ร่วมกับเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส สำหรับแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอบนวุ้นที่เรียกว่า Slab gel ค่าที่อ่านได้จะมีความละเอียดสามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้พัฒนาเป็นระบบ Capillary electrophoresis ซึ่งจะลดขั้นตอนการเตรียมแผ่นวุ้น และใช้งานได้สะดวก และแม่นยำขึ้น สามารถรองรับงานวิจัยด้านจีโนมของสิ่งมีชีวิตและงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆ ได้มาก

ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆในสกุล *Microbispora* ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเมื่อมีการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อที่แยกได้ พบว่าส่วนใหญ่เชื้อที่พบเป็นสายพันธุ์ย่อยในกลุ่มของ *Microbispora rosea* ซึ่งประกอบไปด้วย *Microbispora rosea* subsp. *rosea* และ *Microbispora rosea* subsp. *aerata* โดยการวิเคราะห์ระดับความสัมพันธ์ที่ได้มาจากการหาลำดับเบสในช่วงยีน 16S rRNA gene ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสกุล *Microbispora* ซึ่งจัดอยู่ในแฟมมีลี *Streptosporangiaceae*

ที่มา: (Nakajima และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

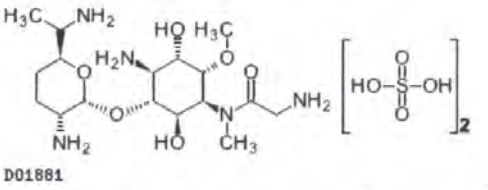
วิธีการทำ ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมและยอมรับกันมากในการใช้อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ไม่ทราบชนิดเทียบกับเชื้อที่ทราบสายพันธุ์ที่แน่นอนแล้ว (Type strain) เช่นเมื่อทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันแล้วพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ร้อยละการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอเท่ากับร้อยละ 70 ขึ้นไปนั่นแสดงว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน โดยทั่วไปแล้ววิธีการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ในสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้นั้นต้องปราศจากเอ็นไซม์ S1 nuclease ในการวิเคราะห์การจับกันของดีเอ็นเอนิยมใช้สารโฟโตไบโอติน (Photobiotin) เป็นตัวติดฉลากดีเอ็นที่ต้องการตรวจสอบแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของโฟโตไบโอตินที่จับอยู่กับดีเอ็นเอ จึงเรียกวิธีการนี้ว่า Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization หรืออาจใช้อีกวิธีคือนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบแยกให้เป็นสายเดี่ยวแล้วยึดบนไนโตรเซลลูโลสหรือแผ่นไนลอน

การศึกษาปริมาณ G+C content เป็นการศึกษาหาปริมาณเบสกวานีนกับไซโตซีน โดยคิดเป็นร้อยละของเบสกวานีนกับไซโตซีนรวมกันเรียกว่า ร้อยละโมล G+C (mole % G+C) สำหรับเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จัดว่ามีปริมาณเบส G+C อยู่ในปริมาณที่สูง คือมากกว่าร้อยละ 50 (นงลักษณ์, 2547) เชื้อในสกุลของ *Microbispora* มีร้อยละโมล G+C อยู่ในช่วง 68.9- 70.8 และพบว่าเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* มีร้อยละโมล G+C เท่ากับ 68.9 -70.2 ส่วน *Microbispora rosea* subsp. *aerata* มีร้อยละโมล G+C เท่ากับ 70.1-70.8 และ *Microbispora coralline* มีร้อยละโมล G+C เท่ากับ 71.2 -71.5 (Nakajima และคณะ, 1999)

2.5 สารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora*

แอคติโนมัยซีทส์เป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่มใหญ่ที่ได้สำรวจ และพบว่าจีนัส *Streptomyces* นี้เป็นกลุ่มจีนัสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จำนวนมาก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งต่อการนำมาศึกษาหาสารปฏิชีวนะ (Okami และ Hotta , 1988) สารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อสกุล*Streptomyces* พบมากถึงร้อยละ 90 ของจำนวนแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างได้มีหลายประเภทได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลิน (Ampicillin) และเพนิซิลิน-เอ็น (Penicillin-N) สารต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ นิสทาซิน (Nystatin) พอลีออกซิน (Polyoxin) และแอนทราไซคลิน (Anthracycline เป็นต้น นอกจากนี้ยังเชื้อสกุลอื่นนอกจาก Streptomyces ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นสารที่สร้างจากเชื้อในแฟมิลี่ *Micromonosporaceae* ได้แก่สกุล *Micromonospora* ดังรูปที่ 7 และ *Actinoplanes* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะแอสโทรมัย-ซิน (Astromicin) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค

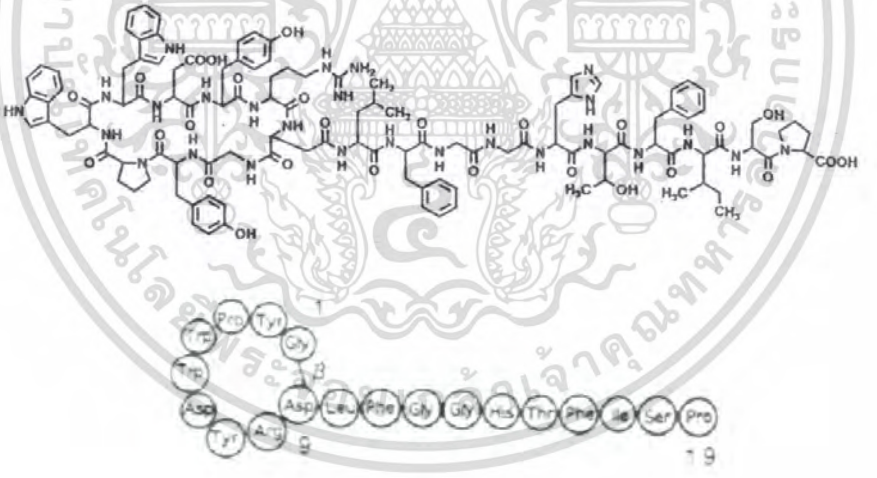
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างสารแอสโทรมัยซิน ซึ่งเป็นปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแฟมิลี่ *Micromonosporaceae*

(ที่มา : www.genome.ad.jp/)

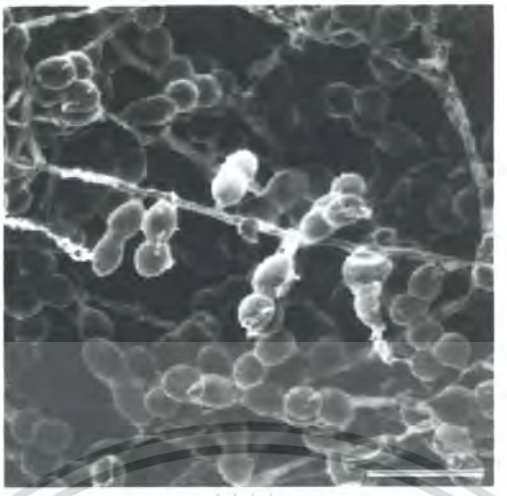
สำหรับเชื้อสกุล *Microbispora* นั้นพบว่าสามารถสร้างสารโปรเปบติน (Propeptin) ภายในโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ตัวเชื่อมต่อกันเป็นวงระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 9 และ 10 แสดงดังรูปที่ 8 โปรเปบตินมีคุณสมบัติเป็น Prolyl endopeptidase inhibitor สร้างได้จากเชื้อ *Microbispora* sp. SNA-115 แสดงดังรูปที่ 9 นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ *Microbispora rosea* จะพบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเพปไทด์เช่นกัน และบางสายพันธุ์จะพบการสร้างผลึกสีม่วง (iodinine) บนอาหารเลี้ยงด้วย (Hayakawa และคณะ, 1991)



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างสารโปรเปบตินที่ผลิตจากเชื้อ *Microbispora* sp.

(ที่มา : Hayakawa และคณะ, 1991 และ Kimura และคณะ, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Microbispora* sp. SNA-115 ที่สามารถสร้างสารโปรเปบติน (**ที่มา** : Kimura และคณะ, 1997)

2.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่องโดยได้ให้ความสำคัญอย่างมากต่อการคิดค้น และพัฒนาเพื่อให้ได้ยาปฏิชีวนะที่มีคุณภาพดีและมีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคมากขึ้น โดยการค้นพบนี้มุ่งไปทางด้านวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยก และคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ในสกุลอื่นนอกจาก *Streptomyces* มากขึ้น ทั้งนี้ในดินก็ยังพบแอคติโนมัยซีทส์จีนัสอื่นโดยเฉพาะสกุล *Microbispora* ซึ่งนำมาผลิตเป็นสารปฏิชีวนะได้ แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตก็น้อยกว่าจีนัส *Streptomyces* อยู่มาก (Nonomura และ Ohara, 1969)

การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (Primary screening test) โดยการขีดเชื้อเป็นเส้นตรงแนวตั้งบนอาหาร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นลากเส้นจุลินทรีย์ทดสอบในแนวขวางตั้งฉากกับแนวของเชื้อ *Microbispora* แต่ให้ไม่สัมผัสกัน การตรวจสอบผลจะดูจากระยะทางการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยจุลินทรีย์ทดสอบที่นำมาศึกษานั้นควรครอบกลุ่มทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา (Boudjella และคณะ, 2006)

การตรวจสอบความไวของสารปฏิชีวนะอีกวิธีหนึ่งคือจะต้องเลี้ยงเชื้อ *Microbispora* ในอาหาร ISP2 ชนิดเหลว ให้เชื้อเจริญในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน จากนั้นคัดกรองแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักแล้วจึงนำน้ำหมักมาทดสอบฤทธิ์ โดยวิธีแผ่นทดสอบฤทธิ์ (Paper

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

disc) วิธีนี้จะอาศัยหลักการแพร่ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้อาหารวุ้นผสมเชื้อทดสอบลงไปในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งจากนั้นเจาะรูอาหารวุ้นเป็นรูปทรงกระบอก แล้วใส่น้ำหมักที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป สารที่ต้องการวิเคราะห์จะแพร่ออกไปตามแนวรัศมีรอบๆบริเวณที่เจาะรู ทำให้ยับยั้งเชื้อหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (งามนิจ, 2550ข) เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสหรือบริเวณการเจริญ (Growth zone) ของเชื้อทดสอบจะแปรตามปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (สมใจ, 2545)

อีกวิธีหนึ่งคือการใช้แผ่นทดสอบฤทธิ์วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ทำการทา (Swab) เชื้อไว้แล้ว ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นแล้วจึงคีบแผ่นทดสอบ ที่ชุบสารปฏิชีวนะแต่ละชนิด ไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานที่ทาเชื้อไว้ โดยให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 15 มิลิเมตร แต่ละแผ่นห่างกันไม่ต่ำกว่า 20 มิลลิเมตร โดยในแต่ละจานให้วางแผ่นทดสอบ เพียงจานละ 5 แผ่น และทำให้แบนราบติดสนิทกับผิวหน้าอาหาร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การอ่านผล จะวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดจากสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดเป็นมิลลิเมตร โดยวัดคร่อมแผ่นทดสอบ 2 ครั้ง ทั้งแนวตั้งและแนวนอน แล้วหาค่าเฉลี่ย (งามนิจ, 2550ข)

2.7 ความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อสกุล *Microbispora*

เชื้อในกลุ่มของแอคติโนมัยซีทส์ถือว่ามีความสำคัญรวมถึงเชื้อในสกุล *Microbispora* เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ พบว่าเชื้อมักมีการสร้างสารทุติยภูมิขึ้นในปลายช่วง Log phase และช่วงต้นของ Stationary phase ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็นแฟมิลี่ (Family) หรือลำดับ (Series) ได้

ประโยชน์ของเชื้อในสกุล *Microbispora* ถือว่ายังมีการศึกษากันน้อย อาจเนื่องจากเชื้อในสกุลนี้มีการกระจายตัวไม่มากตามแหล่งธรรมชาติเมื่อเทียบกับเชื้อสกุลอื่นๆที่มีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ก็มีรายงานว่าเชื้อ *Microbispora* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะโปรเปบติน ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเปบไทด์ต่อกันเป็นวง มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพรลิวเอน-ไดเพปทิเดส (Prolyl endopeptidase)

นอกจากสารปฏิชีวนะแล้วเชื้อในสกุลนี้ยังสามารถสร้างสารอื่นๆได้อีกเช่นเอนไซม์ไพรู-เวทฟอสเฟตไดไคเนส (pyruvate phosphate dikinase; PPDK) (Eisaki และคณะ, 1999) จากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microbispora rosea subsp. *aerata* เอนไซม์ไพรูเวทฟอสเฟตไคไคเนส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน AMP PPi และฟอสโฟอินอลไพรูเวท (Phosphoenolpyruvate) ไปเป็นสารพลังงานสูง (ATP) และไพรูเวท (Pyruvate) และได้มีการศึกษาถึงระดับการโคลนยีนจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ในปี 1996 Anil K. Goyal และคณะ ได้ศึกษาการโคลนยีน *ggh-A* จากเชื้อ *Microbispora* ซึ่งยีนนี้ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ 1,4-บีตา-กลูแคนกลูโคไฮโดรเลส (1,4-beta-glucan glucohydrolase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคส ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อสกุลนี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงและมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Microbispora* ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ อีกเช่นใช้ในการสกัดสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHA) มีคุณสมบัติเป็นไบโอพลาสติก (Lakshman และคณะ, 2006) พบว่าเมื่อนำเซลล์ของ *Sinorhizobium meliloti* ที่สามารถสร้างสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต้มที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ที่ได้เติมหัวเชื้อของ *Microbispora* แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อ *Microbispora* มีส่วนช่วยในการสกัดสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเซลล์ของ *Sinorhizobium meliloti* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	รุ่น BE 600 บริษัท Memmert, Germany
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	HIRAYAMA รุ่น KICLAVE, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus, Japan
4. ตู้ปลอดเชื้อ	รุ่น UV-126 International scientific supply, Thailand
5. เครื่องชั่งสาร ทศนิยม 4 ตำแหน่ง	รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius, Germany
6. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)	EUTECH INSTRUMENT P4510, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง	HErMLE labotechnik รุ่น 36HK, Germany
8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	บริษัท Memmert, Germany
9. ตู้อบฆ่าเชื้อ 180 องศาเซลเซียส	รุ่น LUE 600 บริษัท Memmert, Germany
10. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)	รุ่น MS1, KIKA Worke, Malaysia
11. เครื่องผสมด้วยคลื่นเสียง (Sonicator)	รุ่น 275D บริษัท CREST

3.2 สารเคมี

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
2. สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
3. สารสกัดจากเนื้อ (Meat extract)
4. วุ้น (Agar)
5. กลูโคส (Glucose)
6. เปปโตน (Peptone)
7. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Diphotassium phosphate; K_2HPO_4)
8. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate; $MgSO_4.7H2O$)
9. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl)
10. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate; $(NH_4)_2H2O$)
11. แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate; $CaCO_3$)
12. กลีเซอรอล (Glycerol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. แอล-ไทโรซีน (L-Tyrosine (Difco))
14. แอล-แอสพาราจีน (L-Asparagine (Difco))
15. ไอออนซัลเฟต (Iron sulphate; $FeSO_4.7H_2O$)
16. กรดคาซามิโน (Casamino acid)
17. กรดฮิวมิก (Humic acid)
18. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride; KCl)
19. เบซิกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulfate)
20. นิสทาติน (Nystatin)
21. กรดนาลิดิซิก (Nalidixic acid)
22. เทอร์บินาฟีน (Terbinafin)
23. แป้งที่ละลายได้น้ำ (Soluble stsrch)
24. เจลาติน (Gelatin)
25. ทรีส-กรดไฮโดรคลอริก (Tris-HCl)
26. Tris-SDS
27. เอนไซม์ย่อยเซลล์ (Lysozyme)
28. ซาลีน-อีดีทีเอ (Saline-EDTA)
29. ฟีนอล (Phenol)
30. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
31. เอ็น,เอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนพไทลามีน (*N,N*-dimethyl-L-naphylamine)
32. กรดซัลฟานิลิก (Sulphanilic acid)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างการแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่างๆเช่น ดินภูเขา ดินจากบริเวณปากแม่น้ำ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ตัวอย่างละ 500 กรัม เก็บรักษาตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งดินบางส่วนผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ถึง 3 วันหรือจนกว่าดินจะแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วบดให้ละเอียดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.1.2 การแยกเชื้อ

นำเชื้อจากข้อ 3.3.1.1 มาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ผ่านกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางกายภาพ (Physical treatment) และ/หรือ กระบวนการทางเคมี (Chemical treatment) ดังนี้

กระบวนการทางกายภาพ ได้แก่

1. การผึ่งตัวอย่างดินที่อุณหภูมิห้อง (Air dry treatment)

นำตัวอย่างดินที่ตากแห้งมาบดจนละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ในสารละลายเบซิกลอริลซัลเฟต (Basic lauryl sulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องวอเทกซ์ (vortex) นาน 1 นาที และโซนิเคต (sonicate) 30 วินาที เจือจางตัวอย่างในสารละลาย เบซิกลอริลซัลเฟต ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-5} และเลือกนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} มาเกลี่ยลงบนอาหาร HVA AVA และ SEA ที่เติมสารปฏิชีวนะ นิสทาตินละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรดนาลิไดซิกละลายในโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล (0.2N NaOH) ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทอบินาฟีนละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

2. การใช้ความร้อนแห้ง (Dry heat treatment)

นำตัวอย่างดินที่ตากแห้งและบดจนละเอียดแล้ว อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเบซิกลอริลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องวอเทกซ์ นาน 1 นาที และโซนิเคต 30 วินาที เจือจางตัวอย่างในสารละลายเบซิกลอริลซัลเฟต ให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-4} นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} มาเกลี่ยลงบนอาหาร HVA AVA และ SEA ที่เติมสารปฏิชีวนะ นิสทาตินละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรดนาลิไดซิกละลายในโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอลปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทอบินาฟีนละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

3. การใช้ความร้อนชื้น (Moist heat treatment)

ชั่งตัวอย่างดินที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ในสารละลาย เบซิกลอริลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องวอเทกซ์ นาน 1 นาที และโซนิเคต 30 วินาที ต้มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเจือจางตัวอย่างในสารละลายเบซิกลอริลซัลเฟต ให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} จนถึง 10^{-4} นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} มาเกลี่ยลงบนอาหาร HVA AVA และSEA ที่เติมสารปฏิชีวนะนิสทาตินละลายในดีเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร กรดนาลิไดซิกละลายในโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทอบินาฟีนละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

กระบวนการทางเคมี

นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องวอเทกซ์ นาน 1 นาที จากนั้นบ่มส่วนสารละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างในสารละลายเบซิกลอริลซัลเฟต ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2} จนถึง 10^{-4} นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} มาเกลี่ยลงบนอาหาร HVA AVA และ SEA ที่เติมสารปฏิชีวนะนิสทาตินละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรดนาลิไดซิกละลายในโซเดียมไฮดอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทอบินาฟีนละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

เมื่อบ่มเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อแอคติ-โนมัยซีทส์ โดยตรวจลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ชนิดพิเศษ (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร ISP2 และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง (ISP2 slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น (Primary screening test)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหาร ISP2 โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแล้วขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวๆ จากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่งของจานอาหารเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่ เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว นำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ 6 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และยีสต์ที่ใช้ทดสอบ คือ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยในการทดสอบจะใช้ลูปเขี่ยเชื้อลากจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละสายพันธุ์เป็นเส้นตรง ตั้งฉากกับลอยขีดของเชื้อแอคติโน-มัยซีทส์ ซึ่งลอยขีดของจุลินทรีย์ทดสอบจะต้องไม่ขีดทับกับเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยใช้ไม้บรรทัดวัดระยะทางการยับยั้ง (เซนติเมตร) จากแนวของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จนถึงระยะที่ จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกได้

โดยตรวจสอบลักษณะต่างๆ ของเชื้อดังนี้

3.3.2.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (Morphological and cultural characteristics)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะพิจารณาจากลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร 1/5 ISP2 และ SEA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์แล้วตรวจสอบลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์ชนิดพิเศษ และถ่ายรูปสปอร์

การตรวจสอบลักษณะการเจริญทำโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบที่กำหนดอยู่ใน ISP ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crosstatch streak (Shiring และ Gottlieb, 1966) จากนั้นตรวจผลโดยดูลักษณะการเจริญของเชื้อ สีของโคโลนีทั้งด้านบนและด้านล่างจานอาหาร รวมถึงสีของรงควัตถุที่เชื้อสร้างที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทียบกับระดับสีมาตรฐาน ISC-NBS centroid color charts (Mundie และ David, 1950)

3.3.2.2 ตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีและสรีระวิทยา (Biochemical and physiological characteristics)

1. การใช้แหล่งคาร์บอน

ในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนใช้อาหาร Basal medium agar (Shiring และ Gottlieb, 1966) ซึ่งเติมกรดคาซามิโนลงไปเพื่อให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1 ต่อปริมาตรอาหารก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย

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

ในการเตรียมหัวเชื้อโดยใช้สปอร์ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ ในหลอดทดลองนี้จะได้สารละลายแขวนลอยของเชื้อ นำสารละลายแขวนลอยของเชื้อที่ได้จำนวน 1 ลูป ขีดบนอาหารที่ใช้ทดสอบเป็นเส้นตรง บ่มที่ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดตรวจผลโดยเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเชื้อบนอาหารทดสอบเทียบกับชุดควบคุม (Positive และ Negative control)

การอ่านผลการทดลอง

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

(W) มีการใช้แหล่งคาร์บอนไม่ชัดเจนนัก เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร Basal agar medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนมากกว่าการเจริญบนอาหาร Basal agar medium ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนเล็กน้อย และน้อยกว่าการเจริญของเชื้อบนอาหาร Basal agar medium ที่มีกลูโคส

(-) ไม่มีการใช้แหล่งคาร์บอน เมื่อเชื้อเจริญบนอาหร Basal agar medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อบนอาหาร Basal agar medium ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน

2. การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแอคติโนมัยซีทส์บนอาหร Inorganic salt-starch agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจผลโดยเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีที่เชื้อขึ้น แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเห็นเป็นสีน้ำเงินรอบๆโคโลนี

3. การย่อยสลายและตกตะกอนโปรตีนในนม (Coagulation and peptinization)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในน้ำนม (Skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 21 วัน การตรวจผลถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นพบว่าจากเดิมน้ำนมซึ่งมีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสีขาวใส ถ้ามีการตกตะกอนโปรตีนจะเกิดตะกอนนมตรงก้นหลอดทดลอง

4. การย่อยสลายเจลาติน (Gelatinization)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหาร Bouillon Gelatin Broth จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 21 วัน การตรวจผลโดยนำหลอดทดลองที่เพาะเชื้อไว้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าเชื้อมีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

5. การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในอาหาร Peptone nitrate broth จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 21 วัน ตรวจผลโดยเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก 2 หยด และสารละลายเอ็น,เอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนพไทลามีน 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์สารละลายจะเป็นเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์โดยขีดเชื้อลงบนอาหาร ISP2 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 2 3 4 5 6 และ 7 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ

7. การเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหร ISP2 ซึ่งปรับพีเอชเป็น 4 4.5 5 6 8 และ 9 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจผลจากการเจริญของเชื้อที่ระดับพีเอชต่างๆ

8. การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหาร ISP2 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน จากนั้นตรวจผลการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อตรวจสอบลักษณะดังกล่าวข้างต้นนี้แล้ว จะสามารถจัดเชื้อได้เป็นกลุ่มๆ และนำตัวแทนจากแต่ละกลุ่มหรือเชื้อที่มีความน่าสนใจมาทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

1. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลว ISP2 ที่เติมกรดอะมิโนไกลซีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ถึง 0.3 โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจะเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยสารละลายซาลีน-อีดีทีเอ พีเอช 8 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย 10M Tris-HCl 2 ถึง 3 มิลลิลิตร และเติมไลโซไซม์ประมาณ 10 ถึง 15 มิลลิกรัมพร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากัน ซึ่งไลโซไซม์มีผลในการย่อยผนังเซลล์ จากนั้นบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่งโมง หรือจนกว่าสังเกตเห็นสารละลายเหนียวหนืด เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมสารละลาย 10x SSC 60 ไมโครลิตร และเติม Tris-SDS 500 ถึง 1000 ไมโครลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอลต่อคลอโรฟอร์ม (Phenol : Chloroform) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน 10 ถึง 20 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆ ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในบีกเกอร์เล็กขนาด 50 มิลลิลิตร เติมแอลกอฮอล์ที่แช่เย็น ร้อยละ 99 ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลายดีเอ็นเอในบีกเกอร์ ซึ่งแอลกอฮอล์นี้จะช่วยตกตะกอน ดีเอ็นเอทำให้เห็นเป็นสีขาว จากนั้นใช้แท่งแก้วเล็กหมุน (Spooling) พันเอาสายดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ติดมากับแท่งแก้ว แล้วล้างดีเอ็นเอที่พันบนแท่งแก้วด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และร้อยละ 95 ตามลำดับ ตากดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำแท่งแก้วที่มีดีเอ็นเอติดอยู่นี้ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 1x SSC ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำดีเอ็นเอที่แยกได้เพิ่มปริมาณในช่วงยีน 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA thermal cycler (Gene Amp PCR System 9700 : Applied Biosystems) 16S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์นำมาทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABJ PRISM Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) (DNA technology กำแพงแสน) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะเปรียบเทียบและทำ Alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST program และ alignment software (ในการณีที่ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น Multi-data set และสร้าง Phylogenetic tree ใน MEGA software version 2.1 และวิเคราะห์ Phylogenetic tree ที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดินแถบภาคตะวันตก 5 ตัวอย่างในเขตจังหวัดราชบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ 116 ไอโซเลต (ภาคผนวก ค) และเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยพิจารณาจากรูปแบบการสร้างสปอร์พบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวน 20 ไอโซเลตที่มีรูปแบบการสร้างสปอร์ที่เหมือนกับเชื้อในสกุล *Microbispora* และเมื่อวัดพีเอชของดิน พบว่าพีเอชของดินอยู่ในช่วง 6.84- 7.95 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากวิธีการแยกแต่ละชนิด

ลักษณะดินตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศาเซลเซียส	ต้มที่ 70 องศาเซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอล ร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินร่วนที่ราบเชิงเขา	ราชบุรี	RB2-2	7.25	-	-	-	+	-	+	-
		RB2-9		-	-	-	+	-	-	+
		RB2-12		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-13		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-14		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-15		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-16		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-22		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-35		-	-	-	-	-	+	-
		RB11-6	6.84	-	-	-	+	-	-	+
		RB11-19		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-1	7.30	-	-	-	+	-	+	-
		RB20-2		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-3		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-4		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-5		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-6		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-7		-	-	-	+	-	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5. (ต่อ)

ลักษณะดินตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศาเซลเซียส	ต้มที่ 70 องศาเซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอลร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินเหนียวปนทรายแป้งชุ่มแฉะ	กาญจนบุรี	KB2-1	7.95	-	-	-	+	-	+	-
		KB2-13		-	-	-	+	-	+	-

หมายเหตุ + คือรหัสเชื้อที่แยกได้จากวิธีการแยกและอาหารแต่ละชนิดที่ใช้

- คือรหัสเชื้อที่ไม่สามารถแยกได้จากวิธีการแยกและอาหารแต่ละชนิดที่ใช้

AVA= Arginine-Vitamin Agar HVA= Humic acid Vitamin Agar SEA= Soil extract Agar

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ 20 ไอโซเลตที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อในสกุล *Microbispora* (ภาคผนวก ง) เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และ 1000 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า เชื้อดังกล่าวนี้สามารถสร้างสปอร์คู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้น ลักษณะทางสรีรวิทยาจะพิจารณาจากการเจริญในอาหารเลี้ยงชนิดต่างๆ ตลอดจนช่วงอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของโซเดียวคลอไรด์ในระดับที่แตกต่างกัน การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีจะทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย การตกตะกอน และการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะต่างๆทางฟีโนไทป์แล้ว สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 15 กลุ่ม ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลแดง (Moderate Reddish Brown) และ สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร เจริญได้ดีมากบนอาหาร ISP2 Glu.A และ N.A. ดังแสดงในตารางที่ 6 เชื้อในกลุ่มนี้มีเพียง 1 ไอโซเลตคือ RB11-6 แสดงดังรูปที่ 10

เชื้อไอโซเลตนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส และไม่สามารถย่อยสลาย หรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดในการทดลอง มีเพียงน้ำตาล ดี-ไรโบส ดี-ฟรุกโตส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่ไม่สามารถใช้ได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 10 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB11-6 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลือง (Moderate Yellow) และเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม (Strong Yellow) ไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหาร และเจริญได้ดีมาก บนอาหาร ISP2 Glu.A และ Cz.sucrose ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้มีเพียง ไอโซเลตเดียวคือ KB2-1 แสดงดังรูปที่ 11

เชื้อในไอโซเลตนี้จะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6 ถึง 8 ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 45 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายหรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้ สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดที่ทำการทดลอง มีเพียงน้ำตาล ดี-ไรโบส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่เชื้อไม่สามารถใช้ได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 เชื้อไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 11 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต KB2-1 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)
ค สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีครามอมม่วงซีด (Pale Purplish Blue) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลมืด (Dark Brown) สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีน้ำตาลเหลือง (Moderate Yellowish Brown) เจริญได้ดีมาก บนอาหาร O.M. และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 N.A และ P.I.A. ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้มีเชื้อเพียงไอโซเลตเดียว คือ KB2-13 แสดงดังรูปที่ 12

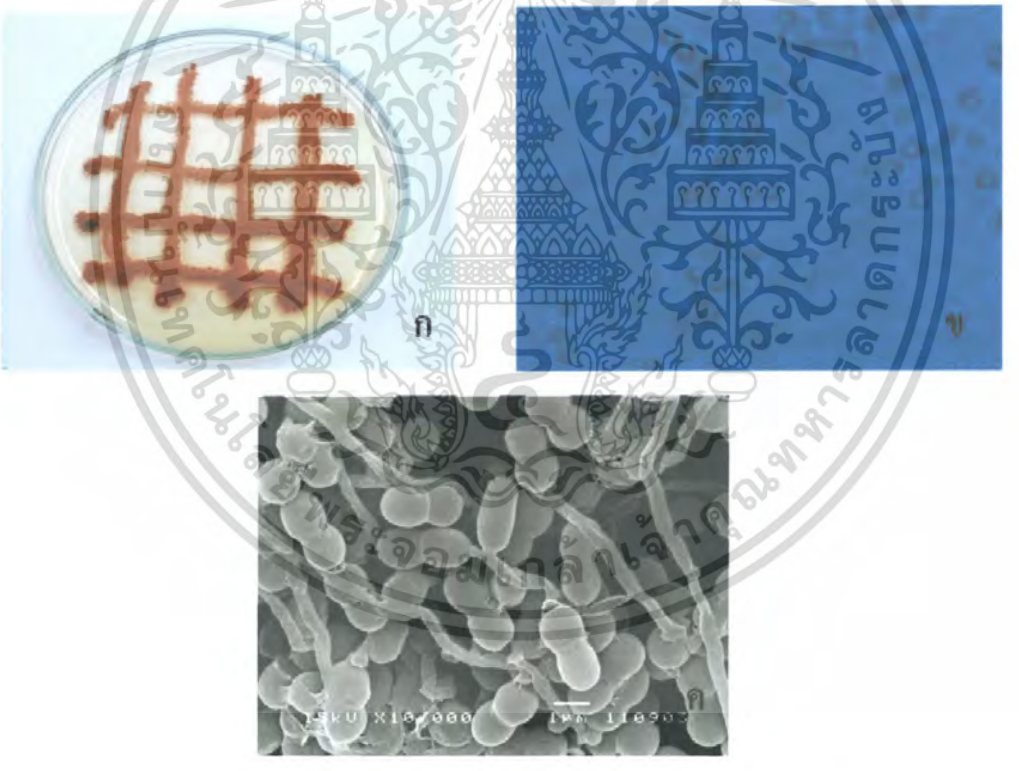
สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดถึงร้อยละ 2 สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลาย และตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลแอล-แรมโนส ดี-รัฟฟีโนส กลีเซอรอล และ ดี-กาแลคโตส ดังแสดงในตารางที่ 8

รูปที่12 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต KB2-13 บนอาหา ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีส้มคล้ำ (Deep Orange) หรือส้มแดงคล้ำ (Deep Reddish Orange) จนถึงสีน้ำตาลแดงเข้ม (Strong Reddish Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลแดงเข้ม ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหาร แสดงดังรูปที่ 13 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 O.M. และN.A. ดังแสดงในตารางที่ 6 เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ RB20-4 RB20-5 RB20-6 และ RB20-7

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้ง 4 ไอโซเลตนี้สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6 ถึง 8 และ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ แอล-แรมโนส ดี-เมลลิไบโอส ดี-รัฟฟีโนส กลีเซอรอล ดี-กาแลคโตส และ ดี-ไซโลส ดังแสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 13 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB20-4 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)
ค สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารสีเหลืองคล้ำ (Deep Yellow) จนถึงเหลืองน้ำตาล (Moderate Yellowish Brown) สามารถสร้างรงควัตถุสีเขียวเหลือง (Strong Greenish Yellow) บนอาหาร แสดงดังรูปที่ 14 และเจริญได้ดีมากบนอาหาร ISP2 เจริญได้ดีบนอาหาร O.M. I.S. T.A. Gly.A. Glu.A. Cz.sucrose และ N.A ดังแสดงในตารางที่ 6 เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 3 ไอโซเลต ได้แก่ RB20-1 RB20-2 และ RB20-3

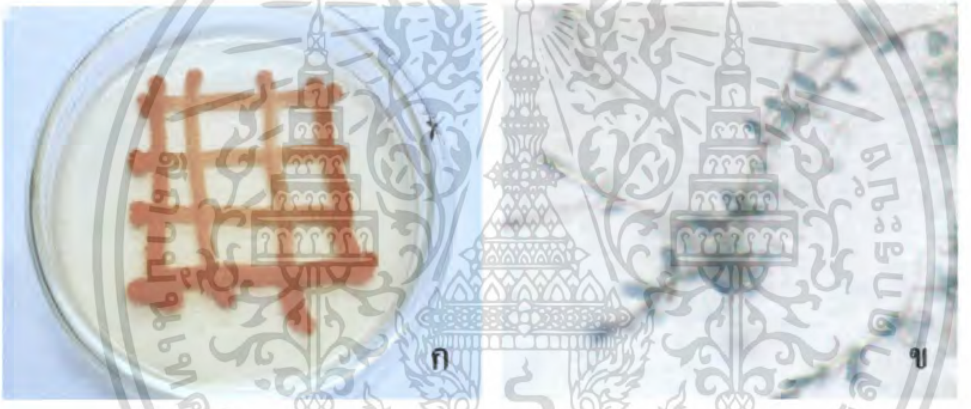
เชื้อในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมได้โดยไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีน ไม่ย่อยแป้ง สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อในกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ ดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส กลีเซอรอล แลคโตส ดี-กาแลคโตส และ เซลโลไบโอส ดังแสดงในตารางที่ 8

รูปที่ 14 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB20-1 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองชมพู (Deep Yellowish Pink) และเส้นใยอาหารสีส้มแดง (Vivid Reddish Orange) ไม่สามารถสร้างรงควัตถุบนอาหาร และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 O.M. Cz.sucrose และ N.A ดังแสดงในตารางที่ 6 มีเพียง 1 ไอโซเลตคือ RB2-14 แสดงดังรูปที่ 15

เชื้อไอโซเลตดังกล่าวเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้สามารถย่อยสลายและตกตะกอนโปรตีนในนม รวมไปถึงสามารถย่อยแป้งได้ แต่ทั้งนี้ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดที่ทำการทดลอง ยกเว้นน้ำตาล ดี-ไรโบส ดี-ฟรุกโตส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถนำไปใช้ได้ ดังแสดงในตารางที่ 8



ก ข

รูปที่ 15 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-14 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลแดงคล้ำ (Deep Reddish Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลคล้ำ (Deep Brown) สร้างรงควัตถุบนอาหารสีน้ำตาลเหลืองเข้ม (Strong Yellowish Brown) และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ดังตารางที่ 6 ซึ่งในกลุ่มนี้มีเพียง ไอโซเลตเดียวคือ RB2-9 แสดงดังรูปที่ 16

เชื้อไอโซเลตนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดเพียงร้อยละ 1.5 เจริญได้ในช่วงพีเอช 6 ถึง 8 และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในนมได้ แต่ไม่ตกตะกอนเจลาติน ไม่ย่อยสลายแป้ง รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากที่ทำการทดลองได้หลายชนิด ได้แก่ ดี-แมนนิทอล ดี-เมลลิไบโอส ดี-รัฟฟิโนส แลคโตส และ ดี-กาแลคโตส ดังแสดงในตารางที่ 8

รูปที่ 16 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-9 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลมืด (Dark Brown) จนถึงสีน้ำตาลคล้ำ (Deep Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาล (Moderate Brown) สามารถสร้างรงควัตถุบนอาหารสีส้มเหลืองสด (Brilliant Orange Yellow) และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 O.M Glu.A และ N.A. ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้พบเพียงไอโซเลตเดียวคือ RB2-12 แสดงดังรูปที่ 17

เชื้อในไอโซเลตนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายหรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากที่ทำการทดลองได้หลายชนิด คือ ดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-เมลลิไบโอส ดี-รัฟฟิโนส กลีเซอรอล แลคโตส และ แอล-อะราบิโนส ดังแสดงในตารางที่ 8

รูปที่ 17 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-12 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Brown) และเส้นใยอาหารสีแดงคล้ำมาก (Very Deep Red) สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีน้ำตาลเหลือง (Moderate Yellowish Brown) และเจริญได้ดีมากบนอาหาร ISP2 เจริญได้ดีบนอาหาร O.M. I.S. T.A. Gly.A. Glu.A. Cz.sucrose และ N.A ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้มีเพียงไอโซเลตเดียวคือ RB2-13 แสดงดังรูปที่ 18

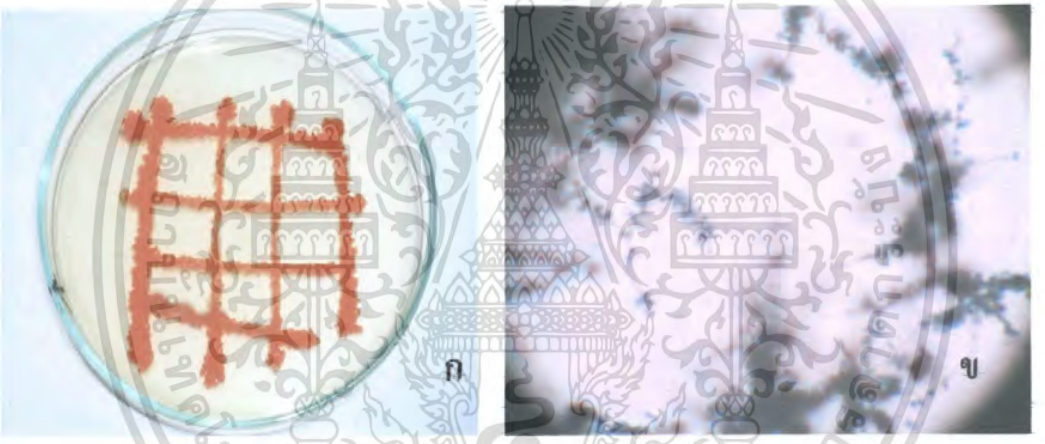
สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงพีเอช 6 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในนมย่อยแป้ง รวมไปถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อในกลุ่มนี้พบว่า จากแหล่งคาร์บอนทั้งหมดที่ทำการทดลองสามารถใช้ ดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-รัฟฟิโนส และ กลีเซอรอล ในการเจริญได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 8 และยังพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีผลด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 18 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-13 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 10 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองชมพูอ่อน (Pale Yellowish Pink) และเส้นใยอาหารสีเหลืองชมพูสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 I.S. Glu.A. และ Cz.sucrose ดังแสดงในตารางที่ 6 เชื้อในกลุ่มนี้มีเพียงไอโซเลตเดียวคือ RB2-16 แสดงดังรูปที่ 19

เชื้อสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงพีเอช 6 ถึง 8 และช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายหรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้งได้ และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้ สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดจากที่ทำการทดลองมีเพียงน้ำตาล ดี-ไรโบส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่เชื้อทั้งสองไอโซเลตไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 8

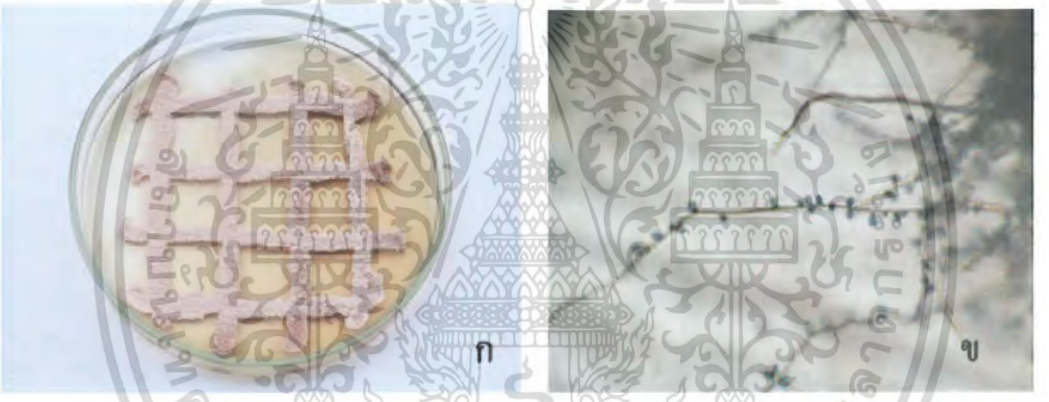


รูปที่ 19 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-16 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 11 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูม่วง (Light Purplish Pink) และเส้นใยอาหารสีส้มแดง (Vivid Reddish Orange) สร้างรงควัตถุลงบนอาหารสีเทาอมเหลือง (Yellowish Gray) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 I.S. Glu.A. และ Cz.sucrose ดังแสดงในตารางที่ 6 มีเพียง 1 ไอโซเลตคือ RB2-35 แสดงดังรูปที่ 20

เชื้อในไอโซเลตนี้ทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม และแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนเจลาติน และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากที่ทำการทดลองได้เพียงไม่กี่ชนิดได้แก่ ดี-แมนนิทอล ซาลิซิน ดี-กาแลคโตส และ ดี-ฟรักโตส ดังแสดงในตารางที่ 8

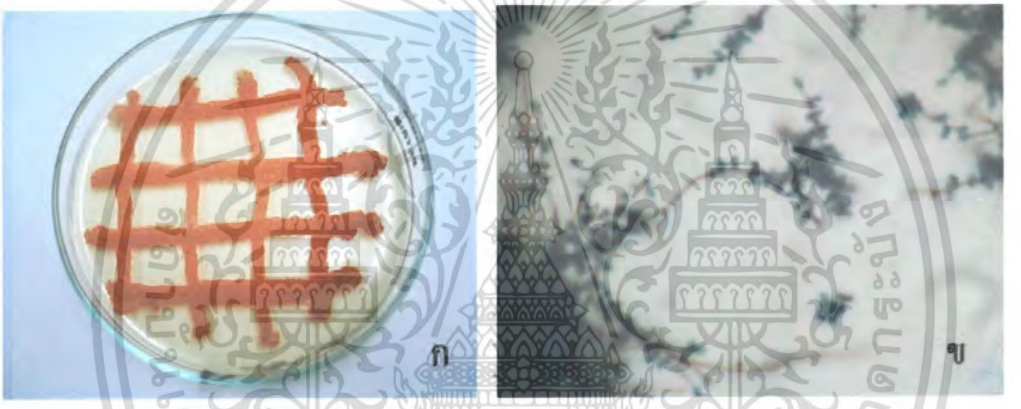


รูปที่ 20 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-35 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 12 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารสีส้มแดง (Vivid Reddish Orange) ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 O.M. Glu.A. และ Cz.sucrose ดังแสดงในตารางที่ 6 มีเพียบไอโซเลตเดียวคือ RB2-2 แสดงดังรูปที่ 21

เชื้อไอโซเลตนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมไปถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดจากที่ทำการทดลอง มีเพียงน้ำตาล ดี-ไรโบส ดี-ฟรักโตส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถใช้ได้ ดังแสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 21 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-2 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 13 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลแดง (Moderate Reddish Brown) และสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown) ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 O.M. และ N.A ดังแสดงในตารางที่ 6 เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้มีเพียงไอโซเลตเดียวคือ RB11-19 แสดงดังรูปที่ 22

เชื้อไอโซเลตนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมไปถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาล แอล-แรมโนส ดี-รัฟฟีโนส กลีเซอรอล และ ดี-กาแลคโตส ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้เชื้อ แอคติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 22 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB11-19 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 14 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown) จนถึงสีน้ำตาลคล้ำ (Deep Brown) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาล (Moderate Brown) สามารถสร้างรงควัตถุบนอาหารสีส้มเหลือง (Brilliant Orange Yellow) และเจริญได้ดีมากในอาหาร O.M. เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ N.A ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้พบเพียงไอโซเลตเดียวคือ RB2-22 แสดงดังรูปที่ 23

เชื้อในไอโซเลตนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายหรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ แต่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรทได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้ ดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-เมลลิไบโอส ดี-รัฟฟิโนส กลีเซอรอล แลคโตส และ แอล-อะราบิโนส ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 23 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-22 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)
ค สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 15 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ที่สร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อน (Light Orange) และเส้นใยอาหารสีส้ม (Moderate Orange) ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหาร และเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 Glu.A. และ Cz.sucrose ดังแสดงในตารางที่ 6 ในกลุ่มนี้มีเพียงไอโซเลต เดียวคือ RB2-15 แสดงดังรูปที่ 24

สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดถึงร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงพีเอช 6 ถึง 8 และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถย่อยโปรตีนในนม เจลาติน รวมถึงไม่สารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไทรทได้ แต่สามารถย่อยสลายแป้งได้ ดังแสดงในตารางที่ 7 เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดจากที่ทำการทดลอง มีเพียงน้ำตาล ดี-ไรโบส และ ดี-ไซโลส เท่านั้นที่เชื้อไอโซเลตนี้ไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีผลต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ดังแสดงในตารางที่ 10

รูปที่ 24 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB2-15 บนอาหาร ISP2
ข สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB11-6	ISP2	ดี	น้ำตาลอมแดงปานกลาง (Moderate Reddish Brown; #712F26)	น้ำตาลเข้ม (Strong Brown; #753313)	-
	O.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดงปานกลาง (Moderate Reddish Brown; #712F26)	น้ำตาลเข้ม (Strong Brown; #753313)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A	ดี	ส้มอมเหลืองปานกลาง(Moderate Orange Yellow; #F7943C)	ส้มอมเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow; #F7943C)	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ส้มสว่าง (Light Orange; #FFA161)	ส้มสด (Brilliant Orange; #FFB841)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
KB2-1	ISP2	ดี	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	เหลืองเข้ม (Strong Yellow; #E59E1F)	-
	O.M.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมเขียว (Greenish White; #F5E6CB)	ขาวอมเขียว (Greenish White; #F5E6CB)	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาวอมม่วง (Purplish White; #FADBC8)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	ครามอมม่วงซีด (Pale Purplish Blue;#8A7F8E)	น้ำตาลมืด (Dark Brown; #35170C)	น้ำตาลเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)
	O.M.	ดีมาก	ขาวอมม่วง (Purplish White;#FADBC8)	น้ำตาลเข้ม (Strong Brown; #753313)	-
	I.S.	-	-	-	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
KB2-13	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	เหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow; #C37629)	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	-
	P.I.A.	ดี	น้ำตาลมืด (Dark Brown; #35170C)	น้ำตาลมืด (Dark Brown; #35170C)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงค-วัตถุ
	ISP2	ดี	ส้มอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Orange; #A91D11)	น้ำตาลเข้มอมแดง (Strong Reddish Brown; #7F180D)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
RB20-4	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	ส้มปานกลาง (Moderate Orange; #E8793E)	ส้มปานกลาง (Moderate Orange; #E8793E)	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ส้มสว่าง (Light Orange; #FFA161)	ส้มสว่าง (Light Orange; #FFA161)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	น้ำตาลเข้มอมแดง (Strong Reddish Brown; #7F180D)	น้ำตาลเข้มอมแดง (Strong Reddish Brown; #7F180D)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงปานกลาง (Moderate Reddish Orange; #D35339)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
RB20-5	Gly.A	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	แดงปานกลาง (Moderate Red; #AB343A)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงค-วัตถุ
RB20-6	ISP2	ดี	ส้มคล้ำ (Deep Orange; #C34D0A)	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange; #B15124)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงปานกลาง (Moderate Reddish Orange; #D35339)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงค-วัตถุ
	ISP2	ดี	ส้มอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Orange; #A91D11)	ส้มอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Orange; #A91D11)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Orange; #A91D11)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
RB20-7	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	ชมพูเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Pink; #FF7A5C)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	P.I.A.	ดี	ชมพูอมเหลืองมืด (Dark Yellowish Pink; #CC6C5C)	ชมพูอมเหลืองมืด (Dark Yellowish Pink; #CC6C5C)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดีมาก	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	เหลืองอมเขียวเข้ม (Strong Greenish Yellow; #CCA817)
	O.M.	ดี	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
RB20-1	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB20-2	ISP2	ดีมาก	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	เหลืองอมเขียวเข้ม (Strong Greenish Yellow; #CCA817)
	O.M.	ดี	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB20-3	ISP2	ดีมาก	เหลืองคล้ำ (Deep Yellow; #B57900)	เหลืองคล้ำ (Deep Yellow; #B57900)	เหลืองอมเขียวเข้ม (Strong Greenish Yellow; #CCA817)
	O.M.	ดี	เหลืองคล้ำ (Deep Yellow; #B57900)	เหลืองคล้ำ (Deep Yellow; #B57900)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	เหลืองปานกลาง (Moderate Yellow; #D79D41)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB2-14	ISP2	ดี	ชมพูอมเหลืองคล้ำ (Deep Yellowish Pink; #F64A46)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	O.M.	ดี	ชมพูอมเหลืองคล้ำ (Deep Yellowish Pink; #F64A46)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มคล้ำ (Deep Orange Yellow; #D76E00)	เหลืองอมส้มคล้ำ (Deep Orange Yellow; #D76E00)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	น้ำตาลอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Brown; #490005)	น้ำตาลคล้ำ (Deep Brown; #4D220E)	น้ำตาลเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Brown; #95500C)
	O.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดงคล้ำ (Deep Reddish Brown; #490005)	น้ำตาลคล้ำ (Deep Brown; #4D220E)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
RB2-9	Gly.A.	น้อย	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	Cz.sucrose	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	-
	N.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	น้ำตาลมืด (Dark Brown; #35170C)	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	เหลืองอมส้มสด (Brilliant Orange Yellow; #FFB02E)
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ (Deep Brown; #4D220E)	เหลืองอมส้มเข้ม (Strong Orange Yellow; #FF8E0D)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
RB2-12	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow; #C37629)	เหลืองเข้ม (Strong Yellow; #E59E1F)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB2-13	ISP2	ดีมาก	น้ำตาลเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Brown; #95500C)	แดงคล้ำมาก (Very Deep Red; #4F0014)	น้ำตาลเหลือง Moderate (Yellowish Brown; #7D512D)
	O.M.	ดี	น้ำตาลเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Brown; #95500C)	แดงคล้ำมาก (Very Deep Red; #4F0014)	-
	I.S.	น้อย	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	T.A.	ดี	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	Gly.A.	ปานกลาง	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	เหลืองมืด (Dark Yellow; #B07D2B)	-
	Cz.sucrose	ดี	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	-
	N.A.	ดี	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange; #B15124)	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange; #B15124)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	ชมพูอมเหลืองซีด (Pale Yellowish Pink; #FFC8A8)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	O.M.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	-
	I.S.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	-
RB2-16	Gly.A.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองซีด (Pale Yellow; #FFDB8B)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	ชมพูอมม่วงสว่าง (Light Purplish Pink; #FFA8AF)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	เทาอมเหลือง (Yellowish Gray; #CAA885)
	O.M.	ปานกลาง	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish ; #F13A13Orange)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	I.S.	ดี	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	เหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow; #C37629)	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มซีด (Pale Orange Yellow; #FFCA86)	เหลืองอมส้มเข้ม (Dark Orange Yellow; #C37629)	-
RB2-35	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองซีด (Pale Yellow; #FFDB8B)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink;#FF845C)	ชมพูเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Pink; #FF7A5C)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
RB2-2	ISP2	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	ส้มอมแดงสว่าง (Vivid Reddish Orange; #F13A13)	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม (Strong Orange Yellow; #FF8E0D)	เหลืองอมส้มเข้ม (Strong Orange Yellow; #FF8E0D)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	น้ำตาลแดงปานกลาง (Moderate Reddish Brown; #712F26)	น้ำตาลเข้ม (Strong Brown; #753313)	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงปานกลาง (Moderate Reddish Orange; #D35339)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
RB11-19	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	ชมพูเข้มอมเหลือง (Strong Yellowish Pink; #FF7A5C)	ชมพูอมเหลืองสะท้อนแสง (Vivid Yellowish Pink; #FF845C)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	น้ำตาลเข้ม (Strong Brown; #753313)	น้ำตาลปานกลาง (Moderate Brown; #673923)	เหลืองอมส้มสด (Brilliant Orange Yellow; Brilliant Orange Yellow)
	O.M.	ดีมาก	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange; #B15124)	ส้มอมน้ำตาล (Brownish Orange; #B15124)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	ขาวอมเหลือง (Yellowish White; #FFE2B7)	-
RB2-22	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	-
	P.I.A.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลือง (Moderate Yellowish Brown; #7D512D)	น้ำตาลอมเหลืองสว่าง (Light Yellowish Brown; #BB8B54)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
	ISP2	ดี	ส้มสว่าง (Light Orange; #FFA161)	ส้มปานกลาง (Moderate Orange; #E8793E)	เหลืองอมส้มสด (Brilliant Orange Yellow; #FFB02E)
	O.M.	ปานกลาง	ส้มสว่าง (Light Orange; #FFA161)	ส้มปานกลาง (Moderate Orange; #E8793E)	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	เหลืองอมส้มสว่าง (Light Orange Yellow; #FFB961)	-
RB2-I5	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	Glu.A.	ดี	ส้มเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow; #F7943C)	ส้มเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow; #F7943C)	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี (Colorless)	ไม่มีสี (Colorless)	-
	N.A.	ปานกลาง	ส้มเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow; #F7943C)	ส้มเหลืองปานกลาง (Moderate Orange Yellow; #F7943C)	-
	P.I.A.	-	-	-	-

หมายเหตุ ISP2 = Yeast extract-malt extract agar, O.M. = Oatmeal agar, I.S. = Inorganic salts-starch agar, T.A. = Tyrosine agar, Gly.A. = Glycerol-asparagine agar, Glu.A. = Glucose asparagines agar, Cz.sucrose = Czapek's sucrose agar, N.A. = Nutrient agar, P.I.A = Peptone-yeast extract iron agar

 # รหัสสีตามแบบแผน RPG Colour

- ไม่แสดงการตรวจพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแต่ละไอโซเลต

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ (เปอร์เซ็นต์)							พีเอช					อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)					Skim milk		การย่อยแป้ง	การย่อยเคซีน	การย่อยเจลาติน	การย่อยไขมัน	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	ย่อย	ไม่ย่อย					
1	RB11-6	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	KB2-1	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	w	+++	+	+	+	++	++		-	-	-	-	-	-	-
3	KB2-13	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	RB20-4	+++	++	+	-	-	-	-		-	w	+++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RB20-5	+++	++	+	-	-	-	-		-	w	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RB20-6	+++	++	+	-	-	-	-		-	w	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RB20-7	+++	++	+	-	-	-	-		-	w	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	RB20-1	++	++	-	-	-	-	-		-	w	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	RB20-2	++	++	-	-	-	-	-		-	w	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	RB20-3	++	++	-	-	-	-	-		-	w	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
6	RB2-14	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	w	+++	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
7	RB2-9	++	w	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	RB2-12	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9	RB2-13	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	w	+++	+	w	+++	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
10	RB2-16	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	w	+++	+	w	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	RB2-35	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	w	+++	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
12	RB2-2	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	RB11-19	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14	RB2-22	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
15	RB2-15	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	w	+++	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

ตารางที่ 8 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแต่ละไอโซเลต

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่																			
	1	2	3	4				5			6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	RB11-6	KB2-1	KB2-13	RB20-4	RB20-5	RB20-6	RB20-7	RB20-1	RB20-2	RB20-3	RB2-14	RB2-9	RB2-12	RB2-13	RB2-16	RB2-35	RB2-2	RB11-19	RB2-22	RB2-15
Utilization of :																				
D-Mannitol	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	-	-	w	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w	+	w	w	-	-	w	-	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w	+	+	+	+	w	-	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	w	-	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	-	-	-	-	w	w	w	+	-	+	w	+	+	+	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	w	+	w	+	w	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+	+	w	+
L-Arabinose	+	+	+	w	w	w	w	w	w	-	+	w	-	-	+	-	+	w	+	-
Cellobiose	w	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	w	-	w	-	w	-	-	+
D-Fructose	-	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ +++ เจริญได้ดีมาก ++ เจริญได้ดี + เจริญได้ปานกลาง w เจริญได้น้อย

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของยีนในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์วิวัฒนาการ

จากข้อมูลลักษณะการเจริญ สรีระวิทยา และชีวเคมี ได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* ของไอโซเลตที่น่าสนใจ 2 ไอโซเลต ได้แก่ KB2-1 และ RB20-4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA gene เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างจากเชื้อไอโซเลตอื่นๆ

พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB2-1 มีตำแหน่งบน Phylogenetic tree ใกล้เคียงกับเชื้อ *Microbispora corallina* JCM 10267^{T} (AB018046) แสดงดังรูปที่ 25 แต่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* (*M. parva*) ATCC 3332 (U48985) มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.20 ดังแสดงในตารางที่ 9

ไอโซเลต RB20-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^{T} (AB369119) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.20 ดังแสดงในตารางที่ 9 และมีตำแหน่งบน Phylogenetic tree ใกล้เคียงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^{T} ที่ระดับความเชื่อมั่นข (Bootstrap values) ร้อยละ 68 แสดงดังรูปที่ 25

และเมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตคือ KB2-1 และ RB20-4 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งกันและกัน และเทียบกับเชื้อในสกุล *Microbispora* แต่ละสายพันธุ์ พบว่าเชื้อไอโซเลต KB2-1 มีลักษณะความคล้ายกับไอโซเลต RB20-4 ที่ระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 99.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงค่าความคล้ายคลึง (Similarity value) ของเชื้อไอโซเลต RB20-4 และ KB2-1 เทียบกับเชื้อ *Microbispura* สายพันธุ์ใกล้เคียงที่สุด

	U48989	U48990	RB20-4	AB369119	U48988	KB2-1	AB018046	U48986	U48984	U48987	U48985
U48989	100.00	99.50	98.90	98.50	97.90	98.50	97.90	98.00	98.20	98.60	98.50
U48990	99.50	100.00	98.90	98.30	97.90	98.50	98.10	98.10	98.40	98.60	98.60
RB20-4	98.90	98.90	100.00	99.20	98.30	99.10	98.20	98.30	98.40	97.90	98.90
AB369119	98.50	98.30	99.20	100.00	98.90	98.60	97.80	97.70	97.90	97.40	98.20
U48988	97.90	97.90	98.30	98.90	100.00	98.10	97.20	97.60	97.80	97.00	98.10
KB2-1	98.50	98.50	99.10	98.60	98.10	100.00	98.90	99.00	99.10	98.60	99.20
AB018046	97.90	98.10	98.20	97.80	97.20	98.90	100.00	98.40	98.30	98.10	98.60
U48986	98.00	98.10	98.30	97.70	97.60	99.00	98.40	100.00	99.60	98.70	99.20
U48984	98.20	98.40	98.40	97.90	97.80	99.10	98.30	99.60	100.00	98.80	99.10
U48987	98.60	98.60	97.90	97.40	97.00	98.60	98.10	98.70	98.80	100.00	98.50
U48985	98.50	98.60	98.90	98.20	98.10	99.20	98.60	99.20	99.10	98.50	100.00

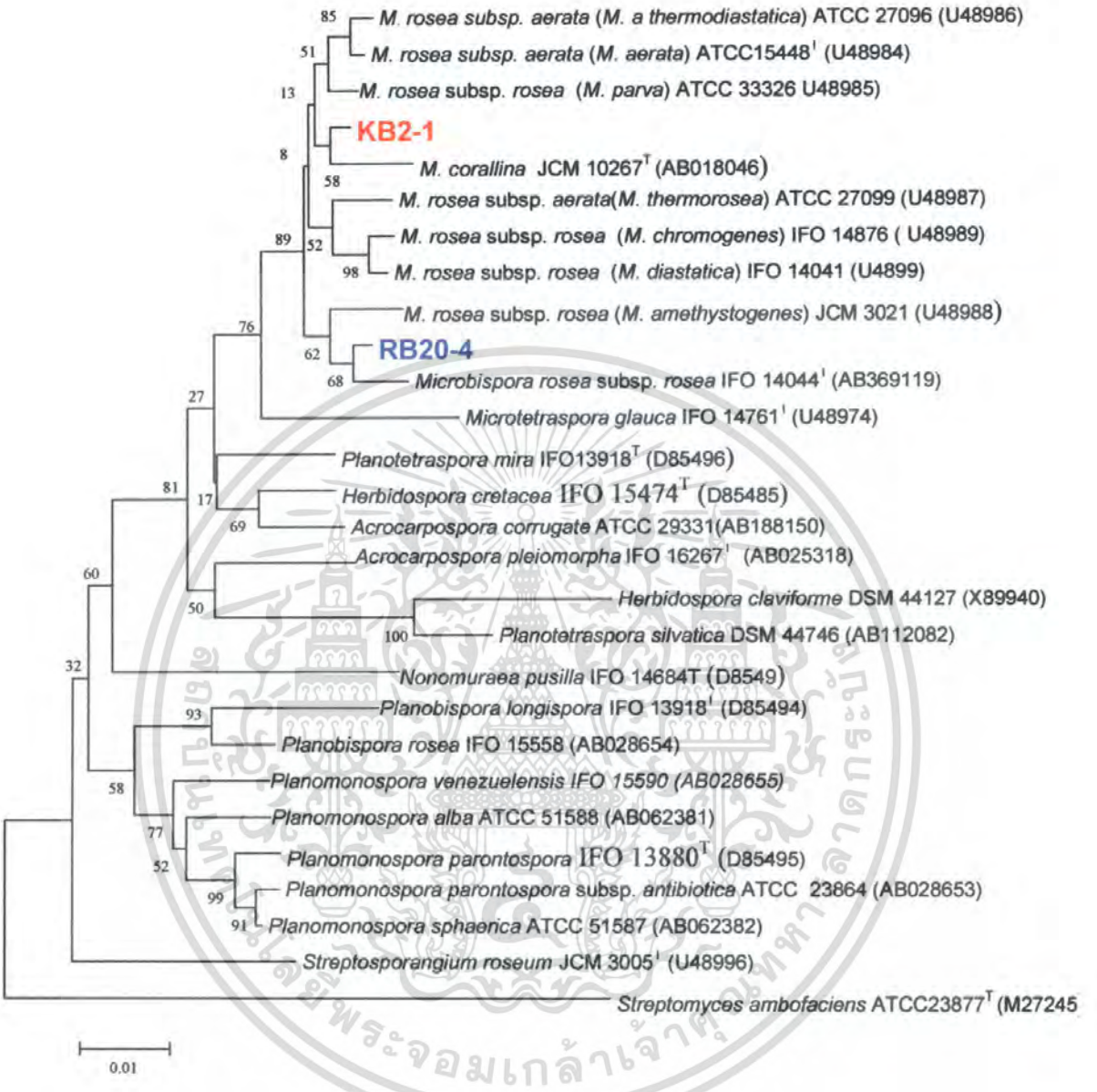
หมายเหตุ U48989 = *Microbispora. rosea* subsp. *rosea* (*M. chromogenes*) IFO 14876 U48990 = *M. rosea* subsp. *rosea* (*M. diastatica*) IFO 14041

AB369119 = *M. rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^{T} U48988 = *M. rosea* subsp. *rosea* (*M. amethystogenes*) JCM 3021

AB018046 = *M. corallina* JCM 10267^{T} U48986 = *M. rosea subsp. aerata* (*M. a thermodiastatica*) ATCC 27096

U48984 = *M. rosea subsp. aerata* (*M. aerata*) ATCC15448^{T} U48987 = *M. rosea* subsp. *aerata*(*M. thermorosea*) ATCC 27099

U48985 = *M. rosea* subsp. *rosea* (*M. parva*) ATCC 33326



รูปที่ 25 แสดงลักษณะของ Phylogenetic tree ของเชื้อไอโซเลต KB2-1 และ RB20-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น

การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อในสกุล *Microbispora* ทั้ง 20 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (คิดเป็นร้อยละ 30) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Escherichia coli	*Pseudomonas aeruginosa*	*Bacillus subtilis*	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
RB11-6	-	-	20	30	-	-
KB2-1	-	-	-	10	-	-
KB2-13	-	-	-	-	-	-
RB20-4	-	-	-	-	-	-
RB20-5	-	-	-	-	-	-
RB20-6	-	-	-	-	-	-
RB20-7	-	-	-	-	-	-
RB20-1	-	-	-	-	-	-
RB20-2	-	-	-	-	-	-
RB20-3	-	-	-	-	-	-
RB2-14	-	-	-	-	-	-
RB2-9	-	-	-	-	-	-
RB2-12	-	-	-	-	-	-
RB2-13	-	-	20	-	-	-
RB2-16	-	-	-	-	-	-
RB2-35	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Escherichia coli	*Pseudomonas aeruginosa*	*Bacillus subtilis*	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
RB2-2	-	-	-	-	-	-
RB11-19	-	-	10	-	-	-
RB2-22	-	-	20	25	-	-
RB2-15	-	-	20	10	-	-

หมายเหตุ *Escherichia coli* = *Escherichia coli* ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Bacillus subtilis = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Micrococcus luteus = *Micrococcus luteus* ATCC 9341

Staphylococcus aureus = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Candida albicans = *Candida albicans* ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด 116 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทยโดยใช้วิธีการทางกายภาพ และทางเคมีในการคัดแยกเชื้อ เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมดที่แยกได้มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยพิจารณาจากรูปแบบของการสร้างสปอร์พบว่ามีเชื้อ 20 ไอโซเลตที่สร้างสปอร์ลักษณะเป็นคู่เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ ลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะเฉพาะของสกุล *Microbispora* และเมื่อพิจารณาจากเทคนิคในการแยกเชื้อพบว่า เชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลตมี 13 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากการใช้สารละลายฟีนอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 6 ไอโซเลตแยกได้จากวิธีอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และมีเพียงไอโซเลตเดียวที่แยกได้ด้วยวิธีต้มตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากเทคนิคการแยกทั้ง 3 เทคนิคนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายฟีนอล 1.5 เปอร์เซ็นต์นั้นมีความเหมาะสมต่อการแยกเชื้อในสกุล *Microbispora*

เมื่อนำเชื้อที่ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต ตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะของการเจริญ ลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มได้ 15 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มนั้นเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ในช่วงพีเอช 6 ถึง 9 ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลต KB2-1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดถึงร้อยละ 3 บางไอโซเลตยังสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม แป้ง และเจลาตินได้ รวมถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท

เมื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่น่าสนใจ 2 ไอโซเลต คือ KB2-1 และ RB20-4 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีน 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลต KB2-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* (*M. parva*) ATCC 3332 (U48985) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.20 ส่วนไอโซเลต RB20-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^{T} (AB369119) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.20

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อ *Microbispora* ร้อยละ 30 ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีผลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้ศึกษามาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าดินภาคตะวันตกในจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรีเป็นแหล่งของทรัพยากรธรรมชาติอีกแหล่งที่มีความน่าสนใจเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์และจุลินทรีย์กลุ่มอื่น เพราะจากการศึกษาตัวอย่างดินเพียงบางตัวอย่างก็สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุล *Microbispora* ได้ ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อหาเชื้อชนิดใหม่ๆเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม และวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

งามนิจ นนทโส. 2537ก. Systematic Bacteriology Laboratory. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2550. การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ ขั้นพื้นฐาน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [Online]. Available : http://www.turffy. com

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วสันต์ ภูผานี. 2549. ยาปฏิชีวนะ. [Online]. Available : http://gotoknow. org

สมใจ ศิริโภค. 2545. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ. นิรนาม. 2550.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil : *Microbiological Research*. 161:4, *288-298*.

Coyne M.S. 1999. Soil micrology: an exploratory. Approach. International Thomson Publuishing company. USA : 102-106.

Crook P., Carpenter C.C. and Klens P.F. 1950. The use of sodium propionate in isolating Actinomycetes from soils. 10 : 655-656.

Davies F.L. and Williams S.T. 1970. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 2 : 239–246.

DSMZ. 2550. [Online]. Available :www.dsmz.de/microorganism/html/

El-Nakeeb M.A. and Lechavalier, H.A. 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbial.* 11 : 75-77.

Genetics computer group, Inc. 1999. Introduction to SeqLab Lecture Notes and Laboratory. Training Course at Office of Biotechnology Research & Development, Bangkok, Thailand, September. 138: 28-30.

Goodfellow M., Williams S.T. and Mordaski M. 1988. Actinomycetes in Biotechnology.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Academic Press Limited, London. 501.

Hayakawa M., Sadakata T., Kajiyra T. and Nonomura H. 1991. New method for the highty selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferment. Bioeng.* 72 : 320-326.

Jiang. C., Xu L., Yang Y.-R., Guo G.-Y., Ma J. and Liu Y. 1991. *Actinobispora*, a new genus of order *Actinomycetalea. Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 : 526-528.

KDGG. 2550. [Online]. Available : www.genome.ad.jp/

Kimura. K., F. Canou. and M. Yoshihama. 1997. A prolyl endopeptidase inhibitor, propeptin inhibition in the various *Microbispora* sp. *Actinomycetol.* 11 : 64-68.

Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classi®cation of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 20 : 435±443.

Lechevalier, M. P., De Bievre, C. & Lechevalier, H. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol.* 5 : 249±260.

Lakshman. K., Shamala.T. R 2006. Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *EMT.* 39 :1471–1475.

Menopause. 2550. [Online]. Available : www.drugs.com/pro/nystatin-oral-suspension.html

Miyadoh S., Tohyama H., Amano S., Shomaru T. and Niida T. 1985. *Microbiospora viridis*, a new species of Actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol. 35* : 281-284.

Miyadoh S., Tohyama H., Amano S., Shomaru T. and Niida T. 1990. Taxonomic review of genus *Microbispora* and proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea. J. Gen. Microbial. 136* : 1905-1913.

Mundie P. and David A. 1995. The NBS/ISCC Color System. PA. Polymath Systems : 535.6 dc-20.

Nakajima Y., Kitpreechavanich V., Suzuki K. I. and Kudo T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1761–1767.

NCBI. 2550. [Online]. Available : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

Nonomura H. 1989. Genus *Streptosporangium* Couch. In : Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4. Williams & Wilkins Co., Baltimore, *MD* . 2545–2551.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nonomura H. and Ohara Y., 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for broth preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strain in soil. *J. Ferment. Technol.* 47:463-4693.

Okami B. and Hotta A.K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Actinomycetes in Biotechnology. *Pergamon Press*, Oxford : 33–67.

Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv. *Appl. Microbial.* 14 : 73-92.

Rao V. A., Prabhu, K. K., Sridhar, B. P., Venkateswarlu, A. &Actor, P. 1987. Two new species of *Microbispora* from Indian soils : *Microbispora karnatakensis* sp. nov. and *Microbispora indica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 181±185.

Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 36 : 407±477.

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

Shomura T., Amano S., Tohyama H., Yoshida J., Ito T. and Niida T. 1985. *Dactylosporangium roseum* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35 : 1-4.

Vitamin K1. 2550. [Online]. Available : www.cyberlipid.org/vitk/vitk0001.htm

Vobis G. 1986. Spore development in sporangia-forming actinomycetes, In: Szabo G., Biro G. and Goodfello M. (eds). Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. 443-152.

Wang, Y., Zhang, Z. & Ruan, J. 1996. A proposal to transfer *Microbispora bispora* (Lechevalier 1965) to a new genus, *Thermobispora* gen. nov., as *Thermobispora bispora* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 933±938

Zhang, Z., Wang, Y. & Ruan, J. 1998. Reclassi®cation of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 411-422.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

Arginine Vitamin Agar

Glucos	1	g
Glycerol	1	g
L-arginine	0.3	g
K_2HPO_4	0.3	g
$MgSO_4 : 7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.3	g
Trace element	0.1	ml
Agar	18	g
น้ำกลั่น	1	L
pH = 6.4		
Vitamins mix A1		1 ml
Nalidixic acid (dissolve in 0.2N NOH)	25	mg
Cycloheximide (dissolve in 95% ethanol)	50	mg.
Terbinafin (dissolve in in 95% ethanol)	1	mg.

Humic acid Vitamin Agar

Humic acid (dissolved in 10 ml 0.2N NOH)	1	g
Yeast extract	50	mg
Casamino acid	20	mg
Na_2HPO_4	0.2	g
KCl	1.7	g
$MgSO_4:7H_2O$	50	mg
$CaCl_2$	10	mg
Trace element mix 1	0.2	ml
Agar	18	g
น้ำกลั่น	1	L
pH = 7.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vitamins mix A1	1	ml
Nalidixic acid (dissolve in 0.2N NOH)	25	mg
Cycloheximide (dissolve in 95% ethanol)	50	mg
Terbinafin (dissolve in in 95% ethanol)	1	mg

Soil extract Agar

$CaSO_4:2H_2O$	0.5	g
$Ca(NO_3)_2:4H_2O$	0.25	g
$MgSO_4:7H_2O$	0.05	g
K_2SO_4	0.03	g
KH_2PO_4	0.02	g
$NaHCO_3$	0.1	g
Trace element mix 1	0.3	ml
$CCl_2:2H_2O$	0.02	g
Yeast extract	0.1	g
Casamino acid	0.1	g
Glucose	0.2	g
Soil extract	100	ml.
Agar	18	g
น้ำกลั่น	1	L
pH = 7.0		
Vitamins mix A1	1	ml
Nalidixic acid (dissolve in 0.2N NOH)	25	mg
Cycloheximide (dissolve in 95% ethanol)	50	mg
Terbinafin (dissolve in in 95% ethanol)	1	mg

Soil extract

Humic soil	1	kg
Demineralized water up to	1	L

sterilization : 15 minutes at 121 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vitamin Mix A1

p-aminobenzoic acid	50	mg
Calcium pantothenate	50	mg
Inositol	50	mg
Niacin	50	mg
Pyridoxine HCl	50	mg
Riboflavin	50	mg
Thiamine HCl	50	mg
Biotin	25	mg
น้ำกลั่น	100	ml

Sterilization by filtration

Trace element mix 1

$CaCl_2:2H_2O$	4	g
$ZnSO_4:7H_2O$	2	g
$Na_2B_4O_7:10H_2O$	0.1	g
$FeSO_4:7H_2O$	5	g
KI	0.05	g
$CoCl_2:6H_2O$	0 .5	g
$CuSO_4:5H_2O$	0.2	g
$MnCl_2:4H_2O$	2	g
$NaMoO_4:2H_2O$	0.5	g
H_2SO_4 95-97% p.a.	1	ml
น้ำกลั่น	1	L

Basic lauryl-sulfate solution

Na-Lauryl-sulfate	0.1	g
KH_2PO_4	1.75	g
K_2HPO_4	3.5	g
น้ำกลั่น	1	L

pH = 6.8-7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yeast extract Malt extract agar, ISP medium no.2

Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1.0	g
Glucose	0.4	g
Agar	1.5	g
pH 7.3		

Oatmeal agar, ISP medium no. 3

Oatmeal	20.0	g
Agar	18.0	g
pH 7.2		

Inorganic salts-starch agar, ISP medium no. 4

Soluble starch	1.0	g
K_2HPO_4	0.1	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	g
NaCl	0.1	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	g
$CaCO_3$	0.2	g
Trace salts solution (A)	0.1	mL
Agar	2.0	g
pH 7.0-7.4		

Glycerol-asparagine agar, ISP medium no.5

Glycerol	1.0	g
L-Asparagine	0.1	g
K_2HPO_4	0.1	g
Trace salts solution (A)	0.1	mL
Agar	2.0	g

Tyrosine agar, ISP medium no. 7

Glycerol	1.5	g
L-Tyrosine (Difco)	0.05	g
L-Asparagine (Difco)	0.1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K_2HPO_4	0.05	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	g
NaCl	0.05	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	g
Trace salts solution (A)	0.1	mL
Agar	2.0	g

pH 7.2-7.4

Trace salt solution (A)

$FeSO_4.7H_2O$	0.1	g
$MnCl_2.4H_2O$	0.1	g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	g
Distilled water	100	mL

Peptone KNO_3 broth

Peptone	1.0	g
KNO_3	0.1	g
NaCl	0.5	g

pH 7.0

Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

Carbohydrate	1.0	g
$(NH_4)_2 SO_4$	0.264	g
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.565	g
KH_2PO_4 anhydrous	0.238	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	g
Pridham and Gottlieb trace salts (B)	0.1	mL
Agar	1.5	g

pH 6.8-7.0

Trace salts solution (B)

$CuSO_4.5H_2O$	0.64	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.11	g
$MnCl_2.4H_2O$	0.79	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$ZnSO_4.7H_2O$	0.15	g

Boullion gelatin broth

Peptone	1.0	g
Meat extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
Gelatin	15.0	g
pH 7.0-7.2		

Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	10.0	g

Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	30	g
Casamino acid, Technical	1.75	g
Starch	0.15	g
Agar	1.7	g
pH 7.3		

Sabouraud's dextrose agar (Difco)

Neopeptone	1.0	g
Dextrose	4.0	g
Agar	1.5	g
pH 5.6-5.8		

Seed medium

Yeast extract	0.4	g
Glucose	0.4	g
Malt extract	1.0	g
pH 7.3		

Production medium

Yeast extract	0.4	g
Glucose	0.4	g
Malt extract	1.0	g
$CaCO_3$	0.1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.3

Peptone-yeast extract iron agar

Bacto-Peptone Iron Agar, dehydrated (Difco)	3.6	g
Bacto-Yeast Extract (Difco)	0.1	g

pH 7.0-7.2

Glucose asparagines agar

Glucose	1	g
Asparagine	0.05	g
K_2HPO_4	0.05	g
Bacto-agar	1.5	g

pH 6.8-7.0

Nutrient agar

Meat extract	1	g
Peptone	1	g
NaCl	0.1-0.2	g
Agar	1.5	g

Czapek's sucrose agar

Sucrose	3	g
K_2HPO_4	0.1	g
$MgSO_4$	0.05	g
KCl	0.05	g
$FeSO_4$	0.001	g
Agar	1.5-1.7	g

pH 7.0-7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

Nitrate reduction test reagent

Sulphanilic acid solution

Sulphanilic acid	0.8	g
5 N Acetic acid	100	mL

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

N,N-dimethyl-1-naphthylamine	0.5	g
5 N Acetic acid	100	mL

Phenol:Chloroform (1:1 v/v)

ละลายฟีนอลในน้ำที่อุณหภูมิ 65 °C จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชา

1 M Tris-HCl pH 8.0

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCL) ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ให้มีพีเอชเท่ากับ 8 ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

0.5M EDTA (pH 8.0)

ละลาย disodium ethylenediaminetetraacetate.2H_2O 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร โดยคนอยู่ตลอดเวลาในขณะเตรียมด้วย magnetic stirrer ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH ซึ่งจะต้องใช้ประมาณ 20 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 11 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง แหล่งที่มา วิธีการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากแต่ละวิธีการคัดแยก

ลักษณะดินตัวอย่าง	สถานที่	รหัสเชื้อ	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศาเซลเซียส	ต้มที่ 70 องศาเซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอล ร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินร่วนที่ราบเชิงเขา	ราชบุรี	RB2-1	7.25	-	-	-	+	-	+	-
		RB2-2								
		RB2-4		-	-	-	+	-	+	-
		RB2-5		-	-	-	+	-	+	-
		RB2-6		-	-	-	+	+	+	-
		RB2-7		-	-	-	+	+	-	-
		RB2-8		-	-	-	+	+	-	-
		RB2-9								
		RB2-10		-	-	+	-	-	-	+
		RB2-11		-	-	-	+	+	-	-
		RB2-12								
		RB2-13								
		RB2-14								
		RB2-15								
		RB2-15								
		RB2-16								
		RB2-17		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-18		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-19		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-20		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-21		+	-	-	-	-	+	-
		RB2-22		+	-	-	-	-	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลักษณะดินตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	สถานที่	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศา-เซลเซียส	ต้มที่ 70 องศา-เซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอล ร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินร่วนที่ราบเชิงเขา	ราชบุรี	RB4-1	7.53	-	-	-	+	-	+	-
		RB4-2		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-3		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-4		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-5		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-6		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-7		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-8		-	-	-	+	+	-	-
		RB4-9		-	-	-	+	+	-	-
		RB4-11		-	-	-	+	+	-	-
		RB4-12		-	-	-	+	+	-	-
		RB4-13		+	-	-	-	+	-	-
		RB4-14		+	-	-	-	-	+	-
		RB4-16		+	-	-	-	-	-	+
		RB4-17		+	-	-	-	-	+	-
		RB4-18		-	-	-	+	-	+	-
		RB4-19		+	-	-	-	-	+	-
		RB4-20		+	-	-	-	-	+	-
		RB11-1	6.84	-	-	-	+	-	+	-
		RB11-3		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-4		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-5		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-6		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-7		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-8		-	-	-	+	-	-	+
		RB11-9		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-10		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-11		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-12		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-13		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-14		-	-	+	-	+	-	-
		RB11-15		-	-	+	-	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลักษณะดินตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	สถานที่	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศาเซลเซียส	ต้มที่ 70 องศาเซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอลร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินร่วนที่ราบเชิงเขา	ราชบุรี	RB11-16	6.84	+	-	-	-	-	+	-
		RB11-17		+	-	-	-	-	+	-
		RB11-18		-	-	+	-	-	+	-
		RB11-19		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-1	7.30	-	-	-	+	-	+	-
		RB20-2		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-3		-	-	-	+	-	+	-
		RB20-4		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-5		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-6		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-7		-	-	-	+	-	-	+
		RB20-8		+	-	-	-	+	-	-
		RB20-9		+	-	-	-	+	-	-
		RB20-10		+	-	-	-	+	-	-
		RB20-11		+	-	-	-	+	-	-
		RB20-12		+	-	-	-	-	+	-
		RB20-13		+	-	-	-	-	+	-
ดินเหนียวลุ่มแม่น้ำ	กาญจนบุรี	KB2-1	7.95	-	-	-	+	-	+	-
		KB2-2		-	-	-	+	-	+	-
		KB2-3		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-4		+	-	-	-	-	+	-
		KB2-5		+	-	-	-	-	+	-
		KB2-6		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-7		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-8		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-9		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-10		+	-	-	-	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ลักษณะดินตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	สถานที่	พีเอช	วิธีคัดแยกเชื้อ				อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อ		
				อบที่ 100 องศา-เซลเซียส	ต้มที่ 70 องศา-เซลเซียส	ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	ฟีนอล ร้อยละ 1.5	AVA	HVA	SEA
ดินเหนียวลุ่มแม่น้ำ	กาญจนบุรี	KB2-11	7.95	+	-	-	-	+	-	-
		KB2-12		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-13		-	-	-	-	-	-	-
		KB2-14		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-15		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-16		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-17		+	-	-	-	+	-	-
		KB2-18		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-19		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-20		+	-	-	-	-	+	-
		KB2-21		+	-	-	-	-	+	-
		KB2-22		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-23		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-24		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-25		+	-	-	-	-	+	-
		KB2-26		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-27		+	-	-	-	-	-	+
		KB2-28		-	-	-	+	-	+	-

หมายเหตุ ตัวอักษรสีแดง แสดงถึงรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora*

\+ คือรหัสเชื้อที่แยกได้จากวิธีการแยกและอาหารแต่ละชนิดที่ใช้

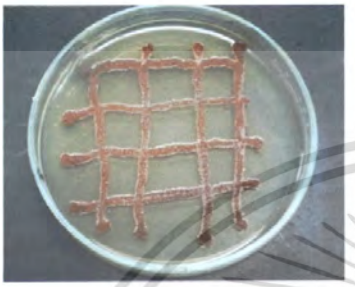
\- คือรหัสเชื้อที่ไม่สามารถแยกได้จากวิธีการแยกและอาหารแต่ละชนิดที่ใช้

AVA= Arginine-Vitamin Agar HVA= Humic acid Vitamin Agar SEA= Soil extract Agar

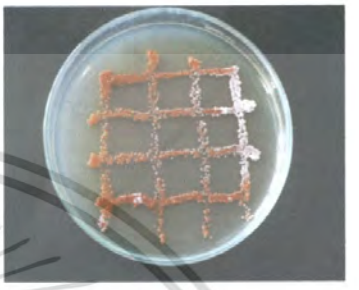
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลักษณะโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศของเชื้อแอคติมัยซีทส์สกุล *Microbispora* จำนวน 20 ไอโซเลตบนอาหาร ISP2



RB11-6



RB20-5

KB2-1

RB20-6

KB2-13

RB20-7

RB20-4

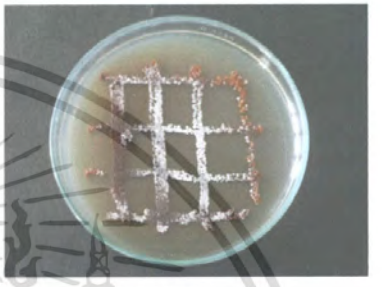
RB20-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RB20-2

RB2-12

RB20-3



RB2-13

RB2-14

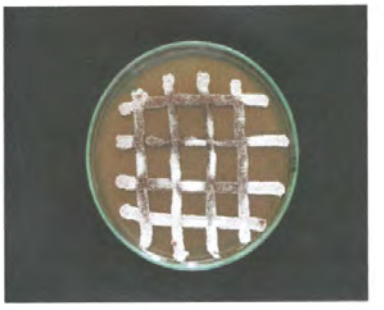
RB2-16

RB2-9

RB2-35

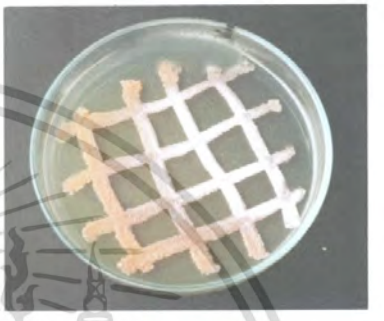
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RB2-2



RB2-22

RB11-19

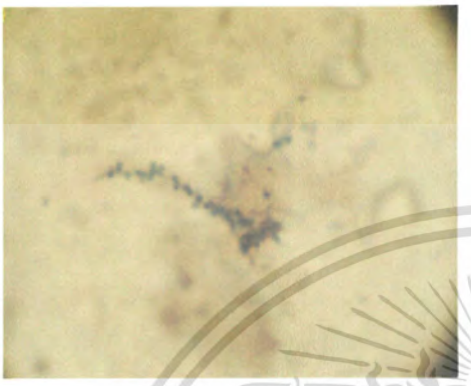


RB2-15

รูปที่ 26 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* 20 ไอโซเลต บนอาหาร ISP2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Microbispora* จำนวน 20 ไอโซเลต ในอาหาร 1/5 ISP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาชนิดใช้แสง โดยใช้เลนส์ที่มีระยะการทำงานสูงด้วยกำลังขยาย 400 เท่า และเลนส์ปกติด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

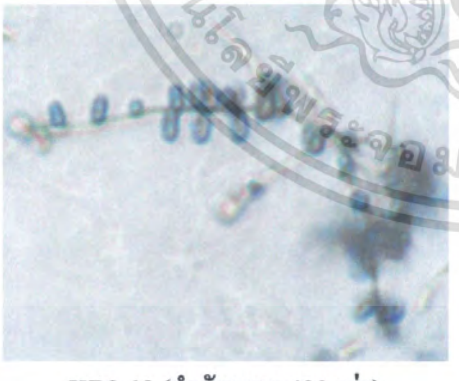


RB11-6 (กำลังขยาย 400 เท่า)

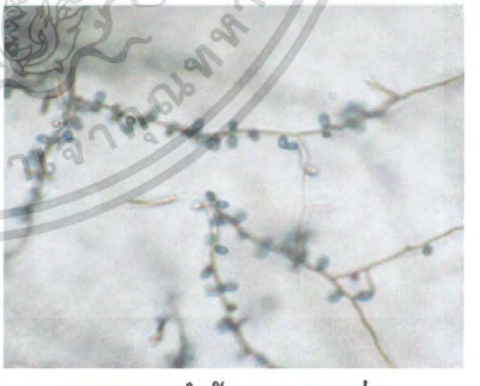
RB20-4 (กำลังขยาย 1000 เท่า)

KB2-1 (กำลังขยาย 400 เท่า)

RB20-5 (กำลังขยาย 1000 เท่า)



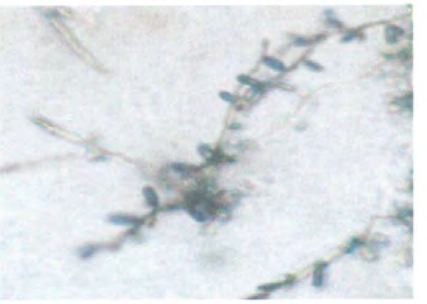
KB2-13 (กำลังขยาย 400 เท่า)



RB20-6 (กำลังขยาย 400 เท่า)

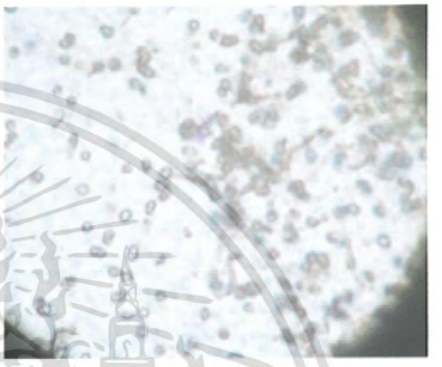
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RB20-7 (กำลังขยาย 400 เท่า)



RB2-14 (กำลังขยาย 400 เท่า)

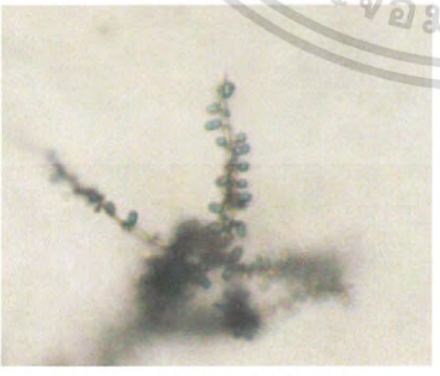
RB20-1 (กำลังขยาย 400 เท่า)



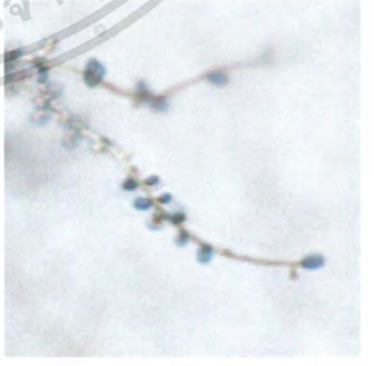
RB2-9 (กำลังขยาย 1000 เท่า)

RB20-2 (กำลังขยาย 1000 เท่า)

RB2-12 (กำลังขยาย 400 เท่า)

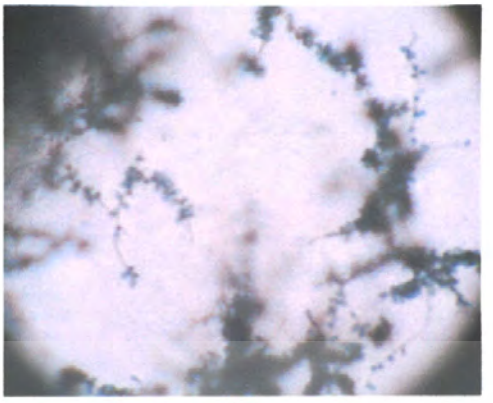


RB20-3 (กำลังขยาย 400 เท่า)

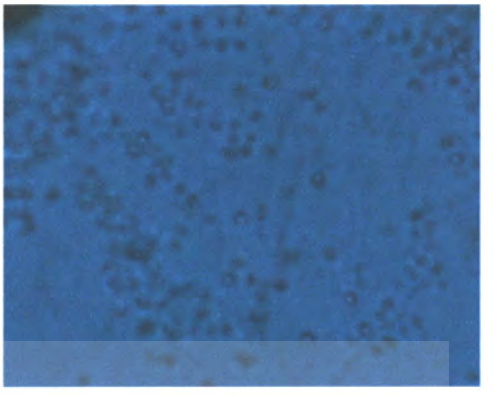


RB2-13 (กำลังขยาย 400 เท่า)

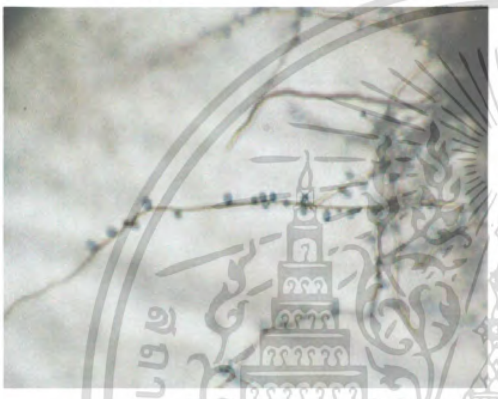
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



RB2-16 (กำลังขยาย 400 เท่า)



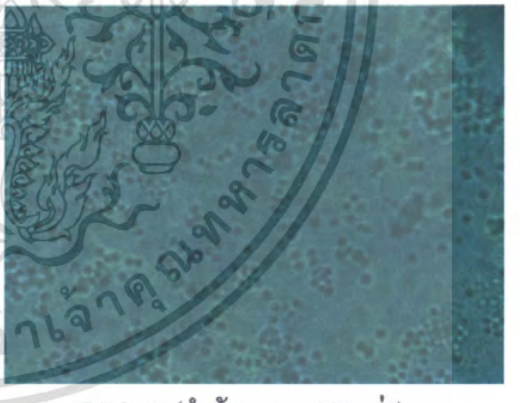
RB11-19 (กำลังขยาย 1000 เท่า)



RB2-35 (กำลังขยาย 400 เท่า)

RB2-22 (กำลังขยาย 400 เท่า)

RB2-2 (กำลังขยาย 400 เท่า)



RB2-15 (กำลังขยาย 1000 เท่า)

รูปที่ 27 แสดงสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* ไอโซเลตต่างๆบนอาหาร 1/5 ISP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

Multiple Sequence Alignment

Multiple Sequence Alignment ของไอโซเลต KB2-1 และ RB20-4

```
Clustal W (1.83) Multiple Sequence Alignment

D85494          ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB028654        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB028653        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB062382        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
D85495          ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB062381        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB028655        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
D85491          ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
D85485          ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB188150        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
AB025318        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
D85496          ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
U48989          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48990          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
RB20-4          ------AGTTTGTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
AB369119        ---------------------------------------------------CATGCAG--TG
U48988          ---------------------------------------------------------GCAAG-TC
KB2             --TTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
AB018046        ------------------------GACGAACG-TGGCGGCGTGCTTAACACAT-CAAGTCG
U48986          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48984          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48987          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48985          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48974          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
U48996          ---------------------------------------------------------GCAAGTCG
X89940          ------------------------------CGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTGA
AB112082        ------------------------GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACATCAAGTCGG
M27245          TCACGGAGGTTTGATCCTGGCTCAGGACAACGCTGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
                                                                          *

D85494          -GCGGAAAGGC--TTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGCAAC
AB028654        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGCAAC
AB028653        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
AB062382        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
D85495          -GCGGAAAAGGCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
AB062381        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGCAAC
AB028655        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
D85491          -GCGGAAAGGC--TTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
D85485          -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
AB188150        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
AB025318        -GCGGAAAAGGCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG-AGTAAC
D85496          -GCGGAAAGGCCCTTCGGG-T-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGAGTAAC
U48989          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48990          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
RB20-4          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
AB369119        AGCGGAA-GGCCCTTCGGGG--ACTCGAGGGGAAA---GGTGAGTAACACGTTGAGTAAC
U48988          GGCGGAAAGGCCCTTCGGGG--TCTCGAGCGCGAA-CGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
KB2             AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
AB018046        -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48986          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48984          -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGG-ACTCGAG-GGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48987          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48985          AGCGGAAAGGCCCTTCGGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48974          -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGG-ACTCGAG-GGTGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
U48996          -GCGGAAAGGCCCTTCGGGGT--CTCGAGCG-CGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
X89940          --GCGGAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
AB112082        --CGGAAAGGCCCTTCGGGGT-ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GAGTAAC
M27245          AACGATGAACCACTTCGGTGG-GGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT-GGGCAAT
                      *****          ** *   *   ******** *****   * **
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
D85494          CTGCCCTCAACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACAAC-CACCG
AB028654        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGAC-CCCTC
AB028653        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-TCGCG
AB062382        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-CCGCG
D85495          CTGCCCCTGACTTTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-CCGCG
AB062381        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-CACTT
AB028655        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGAC-CTCCG
D85491          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-CACTC
D85485          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-ATCTT
AB188150        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACACG
AB025318        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACACG
D85496          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC-ATCTA
U48989          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTT-
U48990          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCATTT-
RB20-4          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTT-
AB369119        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTT-
U48988          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTT
KB2             CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACACG
AB018046        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACATG
U48986          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACATG
U48984          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGAC-ACATG
U48987          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGAC-ACATG
U48985          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACTCC
U48974          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACTT-
U48996          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACACCGTT
X89940          CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC-ACACG
AB112082        CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC-ATT--
M27245          CTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCGCT
                ******  ***  **** *****  ****** ******************

D85494          GTGGCATCGCCTGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB028654        ACCGCATGGTGCGGGGGTGGAAAGTTTTT-CGGTTGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB028653        GCCGCATGGCCTGCGGGTGGAAAGTCTTTTCGGTCGGG-ATGGACTCGCGGCCTATCAGC
AB062382        GCCGCATGGCCTGCGGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGG-ATGGACTCGCGGCCTATCAGC
D85495          GTCGCATGGCCTCCGGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGG-ATGGACTCGCGGCCTATCAGC
AB062381        GCGGCATCGCATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB028655        GCCGCATGGCCTGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTGGGG-ATGGACTCGCGGCCTATCAGC
D85491          CAGGCATCTGGTGGTGGTGGAAAGAACTT-TGGTCAGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
D85485          CCGGCATCGGATGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB188150        ATGGCATCGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB025318        ATGGCATCGTCTGTGTGTGGAAAGTTTT--CGGTTGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
D85496          CCCGCATGGTG-GGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48989          CTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48990          CTCGCATGG-ATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
RB20-4          CTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB369119        CTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48988          CTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
KB2             GTCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
AB018046        GTCGCATGAGCGGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGG-ATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48986          GCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48984          GCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48987          GCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTCGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48985          TCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGC
U48974          CGGGCATCCGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGC
U48996          CCCGATGGGATGGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGTTTGGGGATGGACTTGCGGCCTATCAGC
X89940          ATGGCATCGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTCAGGGATG-ACTCGCGGCCTATCAGC
AB112082        -TCGCATGGGTGGTGTG--GAAAGTTTTTTCGGTTGGGGAGG-GCTCGCGGCCTATCAGC
M27245          TGGGCATCAGGCGGTTC--GAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGC
                   *              *****      * *   * * *  *  ************

D85494          TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB028654        TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB028653        TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB062382        TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
D85495          TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB062381        TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB028655        TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
D85491          TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
D85485          TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB188150        TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB025318        TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
D85496          TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
U48989          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48990          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
RB20-4          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB369119        TTGT-GGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48988          TTGT-GGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
KB2             TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB018046        TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48986          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48984          TTGT-GGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48987          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48985          TTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48974          TTGT-GGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
U48996          TTGT-GGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
X89940          TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
AB112082        TTGTTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
M27245          TTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGG-TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
                **** **** ***   ***  ********************* **********************

D85494          GGCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTC-TACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB028654        GGCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB028653        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB062382        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
D85495          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB062381        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB028655        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
D85491          GGCCCACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
D85485          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB188150        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
AB025318        GGCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
D85496          GGCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
U48989          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48990          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
RB20-4          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
AB369119        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGA-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48988          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGC-TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
KB2             GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
AB018046        GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
U48986          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48984          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAG-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48987          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48985          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48974          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAG-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
U48996          GCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAG-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
X89940          GCCACA-TGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA-ATT
AB112082        GCCACC-TGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAT-ATT
M27245          GCCACACTGGACTGAGACACGGCC-AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG-AATATT
                * * *  ****************** **  ** ******************** *  ***

D85494          GCGCAATGGGCGAAAGCC-TGCGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-GCTTCGGGTT
AB028654        GCGCAATGGGCGAAAGCC-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB028653        GCGCAATGGGCGAAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB062382        GCGCAATGGGCGAAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
D85495          GCGCAATGGGCGGAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB062381        GCGCAATGGGCGGAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB028655        GCGCAATGGGCGGAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
D85491          GCGCAATGGGCGAAAGCC-TGCGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-GCTTCGGGTT
D85485          GCGCAATGGGCGGAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB188150        GCGCAATGGGCGGAAGCT-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
AB025318        GCGCAATGGGCGGAAGCC-TACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-GCTTCGGGTT
D85496          GCGCAATGGGCGGAAGCC-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
U48989          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
U48990          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
RB20-4          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGACCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
AB369119        GCGCAATGGGCGGAAGCCT-ACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGA-GGCCTTCGGGTT
U48988          GCGCAATGGGCGGAAGCCG-AGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGC-GGCCTTCGGGTT
KB2             GCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
AB018046        GCGCAATGGGCGGAAGC-TGACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACG-CCTTCGGGTT
U48986          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
U48984          GCGCAATGGGCGGAAGCC-GAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATG-CGGCCTTCGGGTT
U48987          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
U48985          GCGCAATGGGCGGAAGCCTGAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTT
U48974          GCGCAATGGGCGGAAGCC-GAGCCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATG-CGGCCTTCGGGTT
U48996          GCGCAATGGGCGAAAGCC-GACGCAGCGACG-CCGCGTGGGGGATG-CGGCCTTCGGGTT
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
X89940          GCGCAATGGGCGAAAGCCTGACG-AGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTT-GGGTT
AB112082        GCGCAATGGGCGGAAGCCTGACC-AGCGACG-CCGCGTGGGGGATGACGGCCTC-GGGTT
M27245          GCACAATGGGCGAAAGCCTGA-GCAGCGACG-CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT-
                ** ********* ****       ******* ******* ******  *  **  ****

D85494          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-ATTACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
AB028654        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-ATGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
AB028653        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
AB062382        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
D85495          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
AB062381        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
AB028655        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
D85491          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-GTTACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
D85485          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
AB188150        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
AB025318        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-GTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
D85496          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-GTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48989          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48990          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
RB20-4          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
AB369119        GTAAACCTCTTTCAGCAGG-ACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCG-C
U48988          GTAAACCTCTTTCAGCGGG-ACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCG-C
KB2             GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
AB018046        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA-TTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48986          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48984          GTAAACCTCTTTCAGC-GGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCG-C
U48987          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48985          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
U48974          GTAAACCTCTTTCAGC-GGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCG-C
U48996          GTAAACCTCTTTCAGC-GGGACGAAGTTGACGTG----TACCTGCAGAAGAAGCGCCG-C
X89940          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGAC-TG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
AB112082        GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGAG-TG----TACCTGTAGAAGAAGCGCCGGC
M27245          GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
                *************** ** * ***    *  **    ****** ************* *

D85494          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB028654        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB028653        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB062382        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
D85495          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB062381        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB028655        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
D85491          TAACTACGTGCCAGCAGGCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
D85485          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB188150        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB025318        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
D85496          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48989          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48990          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
RB20-4          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB369119        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48988          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
KB2             TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB018046        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48986          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48984          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48987          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48985          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48974          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
U48996          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
X89940          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
AB112082        TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
M27245          TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
                ************************************ ********************

D85494          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCTGCAGCTTAACTGCG
AB028654        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGCAGCTTAACTGCG
AB028653        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA
AB062382        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA
D85495          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA
AB062381        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCGGGTGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA
AB028655        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCTGCAGCTTAACTGCG
D85491          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTGGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCTTAGGGCTTAACCCTA
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
D85485          GCGTAAAGAGCTCGTAGATGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCATGGCTTAACTATG
AB188150        GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTGCG
AB025318        GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTGCG
D85496          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTGCG
U48989          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48990          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
RB20-4          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
AB369119        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48988          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
KB2             GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
AB018046        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48986          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48984          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48987          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48985          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACG
U48974          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCTTAGGGCTTAACCCTA
U48996          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCACGTCGGGTGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA
X89940          GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCATGGCTTAACTATG
AB112082        GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTGCG
M27245          GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG
                ****************  ***  **  **** *  ********     *******

D85494          GGTCTGCATTCGATACGGGCCGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB028654        GGTCTGCATTCGATACGGGCCGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB028653        GGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB062382        GGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
D85495          GGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB062381        GGTCTGCATCCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB028655        GGTCTGCATTCGATACGGGCCGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
D85491          GGTCTGCGGTGGATACGGGCCGGCTAGAGGTAGGCAGGGGCAAGTGGAATTCCTGGTGTA
D85485          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB188150        GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB025318        GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
D85496          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48989          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48990          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
RB20-4          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB369119        GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48988          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
KB2             GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB018046        GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48986          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48984          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48987          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGTGGAATTCCTGGTGTA
U48985          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48974          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
U48996          GGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGAACGGAATTCCTGGTGTA
X89940          GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
AB112082        GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTA
M27245          GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA
                *******    ********* ********  ** *****  *  ***************

D85494          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
AB028654        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
AB028653        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
AB062382        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
D85495          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
AB062381        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
AB028655        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
D85491          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCTT
D85485          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
AB188150        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
AB025318        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCGG
D85496          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48989          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48990          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
RB20-4          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
AB369119        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48988          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
KB2             GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
AB018046        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48986          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48984          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
U48987          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48985          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48974          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
U48996          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCTT
X89940          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
AB112082        GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAG
M27245          GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT--CTGGGCCGA
                ************************************************ *  *******

D85494          ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--AGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-CTGTAGTCCA
AB028654        ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--AGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-CGGTAGTCCA
AB028653        ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
AB062382        ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
D85495          ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
AB062381        ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
AB028655        ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
D85491          ACCTGACGCTGAGGAGCGAA--AGCGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-CTGTAGTCCA
D85485          TTCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
AB188150        TTCTGACGCTGAGGAGCGAG--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
AB025318        TTCTGACGCTGAGGAGCGAG--AGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-CTGTAGTCCA
D85496          TTCTGACGCTGAGGAGCGAA--AGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-CGGTAGTCCA
U48989          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
U48990          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
RB20-4          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
AB369119        TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC--GGTAGTCCA
U48988          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACT--GGTAGTCCA
KB2             TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
AB018046        TTCTGACGCTGAGGAGCGAA--CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-TGGTAGTCCA
U48986          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
U48984          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA--CTGGTAGTCCA
U48987          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
U48985          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
U48974          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACT--GGTAGTCCA
U48996          ACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACT--GGTAGTCCA
X89940          TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG--AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA-TCCA
AB112082        TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG--AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTG-TCCA
M27245          TACTGACGCTGAGGAGCGAA-GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
                 ****************   * **  ******************    **  ****

D85494          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTCCCGTGCCG-TAGCTA
AB028654        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTCCCGTGCCG-TAGCTA
AB028653        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTTCCGCGCCG-TAGCTA
AB062382        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTTCCGCGCCG-TAGCTA
D85495          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTTCCGCGCCG-TAGCTA
AB062381        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-CCTTCCACGGTTTCCGCGCCG-TAGCTA
AB028655        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGA-CCTTCCACGGTTTCCGTGCCG-TAGCTA
D85491          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGACTTCCGTGCCG-GAGCTA
D85485          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-ACTTCCACGTTCTCCGTGCCG-TAGCTA
AB188150        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-ACTTCCACGTTTCCCGTGCCG-CAGCTA
AB025318        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-GCTTCCACGTTTCCCGTGCCG-TAGCTA
D85496          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCATGGTCCCTGTGCCG-TAGCTA
U48989          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGACTTCTGTGCCG-TAGCTA
U48990          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGA-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
RB20-4          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATCTCTGTGCCG-TAGCTA
AB369119        CGCTGTAAACGTTGGGCG-TAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATCTCTGTGCCG-TAGCTA
U48988          CGCTGTAAACGTTGGGCC-TAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
KB2             CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
AB018046        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
U48986          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGGTTCCTGTGCCG-TAGCTA
U48984          CGCTGTAAACGTTGGGC-CTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
U48987          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
U48985          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCACGATTCCTGTGCCG-TAGCTA
U48974          CGCTGTAAACGTTGGGC-CTAGGTGTGGGGT-GCTTCCACGAGACCCGTGCCGCTAGCTA
U48996          CGCCGTAAACGTTGGGC-CTAGGTGTGGGGGACCTTCCACGGTTTCCGCGCCG-TAGCTA
X89940          CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-ACTTCCACGTTCTCCGTGCCG-TAGCTA
AB112082        CGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG-TCTTCCATGGTCTCTGTGCCG-TAGCTA
M27245          CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCG-CAGCTA
                *** ******* *****  **********     ***** *    * * ****  *****

D85494          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB028654        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB028653        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB062382        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
D85495          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB062381        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB028655        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
D85491          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
D85485          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB188150        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB025318        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
D85496          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48989          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCGGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48990          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
RB20-4          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB369119        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48988          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGGAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
KB2             ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB018046        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48986          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48984          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48987          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48985          ACGCATTAAGCGCCCCGGCCTGGGGAGTACGGC-GCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48974          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
U48996          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
X89940          ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
AB112082        ACGCATTAAGCGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
M27245          ACGCATTAAGTGCCCCG-CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGA
                ********** ****** *************** * ************************

D85494          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGC---AAACCTTA
AB028654        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGA---GAACCTTA
AB028653        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
AB062382        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
D85495          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
AB062381        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
AB028655        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
D85491          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGC---AAACCTTA
D85485          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
AB188150        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACAA---GAACCTTA
AB025318        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGA---GAACCTTA
D85496          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGA---GAACCTTA
U48989          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
U48990          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGTGAAGAACCTTA
RB20-4          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
AB369119        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
U48988          CGGGGGCCCG-ACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGCCAACGCGAAGAACCTTA
KB2             CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
AB018046        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAAC---AAGAACCTTA
U48986          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGCCAACGCGAAGAACCTTA
U48984          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGCCAACGCGAAGAACCTTA
U48987          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
U48985          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGCCAACGCGAAGAACCTTA
U48974          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGAGCCAACGCGAAGAACCTTA
U48996          CGGGGGCC-GCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
X89940          CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGC---GAAACTTA
AB112082        CGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGC---GAACCTTA
M27245          CGGGGGCCCGCACAAGCG---GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCG--AAAACCTA
                ******** * ******* ******** *********** **** ** * **

D85494          CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAACCCT---AGAATGA-----GGTCTTCGACTGGGTGA
AB028654        CCAAGGCTTGACATCACCCGGAAACTCT---AAGTAGA-----CCTCTTGGACTGGGTGA
AB028653        CCAAGGCTTGACATCGCCCGGAAGCCCT---GAATAGC-----CCTCTCGGATCGGGTGA
AB062382        CCAAGGCTTGACATCGCCCGGAAGCTCT---GAATAGC-----CCTCTCGGACCGGGTGA
D85495          CCAAGGCTTGACATCGCCCGGAAGCTCT---GAATAGC-----CCTCTCGGACCGGGTGA
AB062381        CCAAGGCTTGACATCGCCCGGAACACTC---GAATGGG-----CCTCTCGGACCGGGTGA
AB028655        CCAAGGCTTGACATCGCCCGGAACATCC---GAATGGG-----CCTCTCGGACTGGGTGA
D85491          CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAAGCCT---GGAACGA-----GCTCTTCGACTGGGTGA
D85485          CCAAGGTTTGACATCACCCGGAACGGCC---GAATGGG-----CCTCTCGGACTGGGTGA
AB188150        CCAAGGTTTGACATCACCCGGAACGTGC---GAATGTG-----CCTCTCGGACTGGGTGA
AB025318        CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAAGTGC---AGGAGTG-----GCTCTTCGACTGGGTGA
D85496          CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAAATCC---AAGTGGG-----CCTCTTGGACTGGGTGA
U48989          CCAAGGTTTGACATACACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCC-CTCCTTTGGACTGGTGTA
U48990          CCAAGGTTTGACATACACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCC-CTCCTTTGGACTGGTGTA
RB20-4          CCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAAAGATGGGTGC-CTCCTTTGGACTGGTGTA
AB369119        CCAAGGTTTGACATAC---GGAAACACTCAGAGATGGGTGC-CTCCTTTGGAC-GGTGT-
U48988          CCAAGGTTTGACATAC---GGAAACACTCAGAGATGGGTGC-CTCCTTTGGAC-GGTGT-
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
KB2             CCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGC-CTCCTTTGGACTGGTGTA
AB018046        CCAAGGTTTGACATACACCGGAACCTTT---GAACGGG----CCTCCTTGGACTGGTGTA
U48986          CCAAGGTTTGACATACACCGGAAACGCCCAGAGATGGGTGCCTCCTTTTGGACTGGTGTA
U48984          CCAAGGTTTGACATAC---GGAAACGCCCAGAGATGGGTGCCTCCTTTTGG-CTGGT-TA
U48987          CCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGTCTTCCTTTTGGACTGGTGTA
U48985          CCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGACGGGTGC-CTCCTTTGGACTGGTGTA
U48974          CCAAGGTTTGACACCC---GGAAAGCTTCAGAGATGGAG---CCCTCTTCGGATGGTGA-
U48996          CCAAGGCTTGACATCC---GGAAACACT-AGAGATGGGTG--CCTCTTCGGATCGGTGAA
X89940          CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAACGGC-CGAGATGTG------CCTTCGGACGGGTGA-
AB112082        CCAAGGTTTGACATCACCCGGAAACATC-AGAGAGGTG------CCTTCGGATGGGTGA-
M27245          CAAGG---TGACATCA-CCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCC-CCCCTTGTGGTCGGTGTA
                * * *   *****       ****                      *  *   **

D85494          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB028654        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB028653        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB062382        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
D85495          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB062381        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB028655        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
D85491          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
D85485          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB188150        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB025318        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
D85496          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48989          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48990          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
RB20-4          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB369119        -CAGTGG--CATGGC-GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48988          -CAGTGG--CATGGC-GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTTCCGCAACG
KB2             CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG-TTAAGTCCCGCAACG
AB018046        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48986          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48984          -AGGT--TGCATG-CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48987          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48985          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48974          -CGGTGG--CATGGT-GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
U48996          GTGGT-----ATGGC-TTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
X89940          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AB112082        CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
M27245          CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG-CCCGCAAC-
                   **    ***   ***************************** *****  *******

D85494          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGC-CGCAA-A-----CACGTGGTTGGGGA-CTCTGGGA
AB028654        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGC-AGCAACA-----GGGGTGGTTGGGGA-TCATGGGA
AB028653        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCACGC-----GGGGGTGGTGGGGC-TCATGGGA
AB062382        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCACGC-----GGGGGTGGTGGGGC-TCATGGGA
D85495          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCACG------GGGGGTGGTGGGGA-TCATGGGA
AB062381        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCACGC-----GGGGGTGGTGGGGC-TCATGGGA
AB028655        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCAGCC-----GGGGCGGCTGGGGC-TCATGGGA
D85491          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGC-CGCAC-------GCTCGTGGTGGGGA-CTCAGGGA
D85485          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCA-GC-----GGGTG-GCTGGGGA-CCATGGGA
AB188150        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTCC-AGCACGC-----GGGGGTGGTGGGGC-TCATGGGA
AB025318        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGC-AGCA-AC-----GGTCG-GTTGGGGA-CTCTGGGA
D85496          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGC-AGCACGC-----GGGTG--GTGGGGA-CTATGGGA
U48989          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-C-TTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
U48990          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-C-TTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
RB20-4          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-CCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
AB369119        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-CCTTTGGGGTGGTGGGGA-TCATGGGA
U48988          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-C-TTTGGGGTGGTGGGGA-CCATGGGA
KB2             AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-CCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
AB018046        AGCGCAACCCTTGTTCCATGT-GCCAGCACG----------GGTGGTGGGGACT-ATGGGA
U48986          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCATGC-CCGTTTGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
U48984          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-CCGTTTGGGTGGTGGG-ACTCATGGG-
U48987          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCATGC-CCGTTTGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
U48985          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-CT-TTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
U48974          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGC-C-TTTGGGGTGGTGGGGA-TCATGGGA
U48996          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCTCCTTCGGGGTGGTGGGGA-TCATGGGA
X89940          AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCGCGC---------CTTCCTGGGGACTCATGGAG
AB112082        AGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGACGCT---------CTTGGTGGGGACTCATGGAG
M27245          -----AACCCTTGTCCCGT-TTGCCAGCAAGC-CCTTCGGGGTGTTGGGGACTCACGGGA
                     ********* ** * *  *  *                    ****      **
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
D85494          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB028654        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB028653        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB062382        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
D85495          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB062381        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB028655        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
D85491          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
D85485          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB188150        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB025318        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
D85496          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48989          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48990          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
RB20-4          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB369119        ------CGGGGTCAACTCGG-GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48988          ------GGGGGTCAACTCGG-AGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
KB2             GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB018046        GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48986          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48984          -----CCGGGGTCAACTCG-AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48987          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48985          GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48974          ------CGGGGTCAACTCGG-GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
U48996          ------CGGGGTCAACTCGG-GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
X89940          -ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
AB112082        -ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
M27245          GACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
                            ************  ********** *************************

D85494          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCCATACCGTAAGG-TGA
AB028654        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCCATACCGTAAGT-GGA
AB028653        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGGGT-GGA
AB062382        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGGGT-GGA
D85495          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGT-GGA
AB062381        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGGGT-GGA
AB028655        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGGGT-GGA
D85491          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGG-TGA
D85485          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGT-GGA
AB188150        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGGGT-GGA
AB025318        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGG-TGA
D85496          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGCAAGG-GGA
U48989          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48990          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
RB20-4          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
AB369119        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48988          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
KB2             TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
AB018046        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGG-GGA
U48986          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48984          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48987          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48985          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48974          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
U48996          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGCAAGGTGGA
X89940          TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
AB112082        TCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGA
M27245          TCTTGGGCTGCACACGTGCTACA-TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGA
                ************ ** ******* *** *******  * * *** ** ***   *   **

D85494          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB028654        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB028653        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB062382        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
D85495          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB062381        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB028655        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
D85491          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
D85485          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB188150        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB025318        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
D85496          GCGAATCCCTAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48989          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
U48990          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
RB20-4          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB369119        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC-GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48988          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC-ATTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
KB2             GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB018046        GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48986          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48984          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTC-CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48987          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48985          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48974          GCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC-GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
U48996          GCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTC-GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
X89940          G-GAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
AB112082        C-GAATCCCTAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
M27245          GCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
                  ***** * ******** ** *  ************************************

D85494          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB028654        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB028653        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB062382        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
D85495          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB062381        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB028655        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
D85491          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
D85485          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB188150        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB025318        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
D85496          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48989          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48990          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
RB20-4          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB369119        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48988          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
KB2             CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB018046        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48986          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48984          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48987          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48985          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48974          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
U48996          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
X89940          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
AB112082        CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
M27245          CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
                ****************************  ******************************

D85494          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCGCAA
AB028654        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCGTAA
AB028653        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGCTT
AB062382        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCACTT
D85495          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGTTC
AB062381        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCGTAA
AB028655        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCGCAA
D85491          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTG
D85485          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA-CTT
AB188150        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGCTT
AB025318        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCACTT
D85496          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGCTT
U48989          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
U48990          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
RB20-4          CACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
AB369119        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
U48988          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
KB2             CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
AB018046        CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
U48986          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCGT-TT
U48984          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACC---TT
U48987          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCTAACC---CG
U48985          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCA--CT
U48974          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCGGTTT
U48996          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACC---TT
X89940          CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACTCGCAA
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้