

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง
การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ
จากเขตป่าพรุ



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Screening of antibiotic - producing Actinomycetes isolated from peat
swamp forest soils.**



**A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree
of Bachelor of Science**

Department of Applied Biology

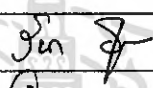

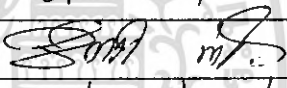
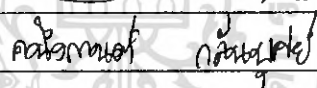
Faculty of Science

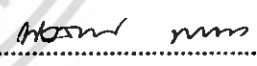
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากเขตป่าพรุ
นักศึกษา นายภาคภูมิ ไพทักษ์ศรี รหัส 46050135
 นายลิขิต เรืองสมบัติ รหัส 46050647
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.จิตภา ทิน้อย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.จิตติ ท่าไวย
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ศศ.วินา ชูโชติ	
กรรมการ ดร.จิตภา ทิน้อย	
กรรมการ ดร.จิตติ ท่าไวย	
กรรมการ อ.คณิงกานต์ กลั่นนุชย์	


 (รศ.ดร.นवलพรรณ วัฒนอง)
 หัวหน้าภาควิชา

**ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์และผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 แอคติโนมัยซีทส์	5
2.2 สารปฏิชีวนะ	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	24
3.2 วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดิน 6 ตัวอย่าง	29
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ	30
4.3 ลักษณะทางฟิโนไทป์ของเชื้อที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	31
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลอง	59 61
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ	9
2	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตได้ในแต่ละปีชีส์	9
3	ตัวอย่างดินบริเวณป่าพรุ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และรหัสเชื้อที่สามารถแยกได้	29
4	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ	30
5	ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ	32
6	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 1	41
7	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่1	42
8	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 2	43
9	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่2	43
10	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 3	45
11	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่3	45
12	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 4	47
13	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่4	47
14	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 5	48
15	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่5	49
16	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 6	50
17	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่6	50
18	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 7	52
19	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่7	52
20	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 8	53
21	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่8	54
22	ตารางแสดงค่า Similarity ของไอโซเลต PY9-21	55
23	ตารางแสดงค่า Similarity ของไอโซเลต PY9-45	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงการจัดจำแนกแอสคิโนไมซีทิสต์	12
2	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Streptomycin	17
3	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Neomycin	18
4	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Kanamycin	20
5	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Gentamicin	21
6	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Netilmicin	22
7	แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Spectinomycin	23
8	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY9-19	41
9	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY9-37	42
10	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY8-7	44
11	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY8 170	46
12	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY3 15	48
13	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY5 131	50
14	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY5 135	51
15	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนไมซีทิสต์ไอโซเลต PY5 133	53
16	Phylogenetic tree ของ PY3-21	57
17	Phylogenetic tree ของ PY9-45	58

โครงการพิเศษเรื่อง	การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากเขตป่าพรุ
นักศึกษา	นายภาคภูมิ ไพทักษ์ศรี นายลิขิต เรืองสมบัติ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.จิตภา ทิน้อย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.จิตติ ท๋าไว

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท์ 25 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากดินป่าพรุในจังหวัดพะเยา ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสามารถสร้างสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 เชื้อแอคติโนมัยซีท์ทั้ง 25 ไอโซเลตสามารถแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ 2 ไอโซเลตคือ PY3-21 และ PY9-45 ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16s rRNA gene ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไอโซเลต PY3-21 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces pseudogriseolus* subsp. *glucofermentans* DSM 40026 และ *S. griseorubens* DSM 40160 ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 96.6 และไอโซเลต PY9-45 มีความคล้ายคลึงกับ *S. endus* NRRL 2339, *S. sporocinereus* DSM 41460 และ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* DSM 40578 ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 98.9%

Special project title	Isolation of antibiotic-producing Actinomycetes Isolate from peat swamp forest soils
Name	Mr.Parkpoom Paitaksri Mr.Likit Rungsombut
Department	Apply biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Dr.Jidapha Tinoi
Special Project co-Advisor	Dr.Chitti Thawai

Abstract

The twenty-five actinomycete strains were isolated from peat swamp forest soils in Payao Province of Thailand. The antimicrobial activity of twenty-five actinomycete strains was determined and revealed that they produced the secondary metabolites and inhibited the growth of tested microorganism, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231. Twenty-five actinomycete strains divided to eight groups using the morphological and cultural characteristics and two actinomycete strains, PY3-21 and PY9-45, were selected for 16s rRNA gene sequence analyses. The result showed that the isolate PY3-21 formed a clade with *Streptomyces pseudogriseolus* subsp. *glucofermentans* DSM 40026 and *S. griseorubens* DSM 40160 at similarity percentage of 99.6 and the isolate PY9-45 formed a clade with *S. endus* NRRL 2339, *S. sporocinereus* DSM 41460 and *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* DSM 40578 at similarity percentage of 98.9

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.จิตภา ทิน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษและ ดร.จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการพิเศษ ที่ให้คำปรึกษาดลอดการดำเนินงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรูปเล่มโครงการพิเศษนี้ให้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ และอาจารย์คณิงกานต์ กลั่นนุศย์ กรรมการที่สละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำปรึกษาดลอดการศึกษา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน

ขอขอบคุณเพื่อนๆและน้องๆที่ช่วยเหลือในระหว่างการทำงานและช่วยเป็นกำลังใจให้ นอกจากนี้ยังมีบิดา มารดา และผู้มีอุปการคุณที่กรุณาอบรมสั่งสอน และอุปการะผู้จัดทำให้สำเร็จการศึกษาได้ด้วยดี

นายภาคภูมิ ไพทักษ์ศรี
นายลิขิต เรืองสมบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ป่าพรุเป็นสังคมพืชป่าไม้ไม่ผลัดใบประเภทหนึ่ง ที่มีลักษณะโครงสร้างและรวบรวมความหลากหลายทางชีวภาพ และมีความสลับซับซ้อนในระบบนิเวศน์ของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์อย่างมากที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างจากสังคมพืชป่าไม้ประเภทอื่น เนื่องจากสภาพพื้นที่ป่ามีน้ำท่วมขังตลอดทั้งปีและมีดินอินทรีย์ที่มีอายุประมาณ 7,000 - 8,000 ปี ซึ่งทับถมกันอยู่อย่างหลวมๆ เป็นชั้นหนาปัจจัยที่ทำให้เกิดป่าพรุ คือเป็นที่ลุ่มต่ำมีน้ำขังมีความชื้นสูง ฝนตกชุกเกือบตลอดปี (เฉลี่ยประมาณปีละ 2,560 มิลลิเมตร) มีอุณหภูมิเฉลี่ยค่อนข้างสูง และพื้นที่เดิมชั้นล่างเป็นดินเลนทะเลมีสารประกอบของกำมะถัน

จากคุณลักษณะของป่าพรุนี้มีความจำเป็นที่จะต้องอนุรักษ์ไว้เพราะ

- 1.1 เป็นป่าที่สูญเสียได้ง่าย โดยเฉพาะถ้าระดับน้ำ และความเป็นกรด - ด่างของน้ำเปลี่ยนแปลงไป
- 1.2 เป็นป่าที่ฟื้นตัวยาก เพราะหากป่าพรุถูกทำลายไป พื้นดินและน้ำจะเป็นกรดอย่างแรงไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของพืช
- 1.3 ป่าพรุเป็นแหล่งควบคุมความสมดุลตามธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และเป็นป่าที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

ป่าพรุนั้นโดยส่วนใหญ่มีฝนชุกและเป็นพื้นที่ลุ่มต่ำ หรือมีสภาพเป็นแอ่งน้ำจืดขังติดต่อกัน มีการสะสมของชั้นอินทรีย์วัตถุหรือดินอินทรีย์ที่หนามากหรือน้อยอยู่เหนือชั้นดินแท้ๆ การสะสมของซากพืชและอินทรีย์วัตถุเกิดขึ้นต่อเนื่องกันในสภาวะน้ำท่วมขังที่ได้จากฝนในแต่ละปี พืชพรรณส่วนใหญ่จึงมีโครงสร้างพิเศษเพื่อดำรงชีพในสภาพสิ่งแวดล้อมเช่นนี้ได้ ป่าพรุมักเกิดในพื้นที่ลุ่มน้ำขังที่รองรับด้วยดินอินทรีย์อันเกิดจากซากพืชซากสัตว์ที่หนาตั้งแต่ 1 - 10 เมตร หรือมากกว่า สภาพความเป็นกรด - เบสของน้ำ ระหว่าง 4.5 - 6.1 เพราะดินชั้นล่างมีสารประกอบซัลเฟอร์ในปริมาณที่สูง ในป่าพรุมีพืชพันธุ์เด่น ๆ ซึ่งจากลักษณะของป่าพรุที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ ทำให้ป่าพรุเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการศึกษาด้านจุลินทรีย์ซึ่งจากความหลากหลายทางชีววิทยาที่มีอยู่ของป่าพรุนั้นมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตปรับสภาพให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในแหล่งน้ำขังที่มีการไหลของน้ำและการขึ้นลงของน้ำตลอดเวลา ทำให้มีโอกาสในการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่อาจมีความสามารถในการผลิตสารต่างที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีความโดดเด่นในการสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์

แอคติโนมัยซีทส์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา โดยมีเส้นใยแตกกิ่งก้านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร และสามารถสร้างสปอร์ชนิดไม่อาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพศ ลักษณะสปอร์ที่เชื้อสร้างขึ้นก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสปอร์ที่สร้างขึ้นก็จะมีควมทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี จึงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยปกติเมื่ออยู่ในธรรมชาติจะมีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารซึ่งเป็นการทำให้เกิดสมดุลและความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศน์

นอกจากจะเป็นผู้ย่อยอินทรีย์สารที่สำคัญในธรรมชาติแล้ว แอคติโนมัยซีทส์ยังเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะใหม่ ๆ ที่สำคัญอีกด้วยซึ่งกว่า 10,000 ชนิดของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีต้นกำเนิดมาจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแอคติโนมัยซีทส์ซึ่งถือเป็นจุลินทรีย์ที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากกว่า 90 % ของสารปฏิชีวนะที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ และ 2 ใน 3 จาก 10,000 ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ล้วนผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์

เนื่องจากปัจจุบันมีการตรวจพบโรคใหม่ ๆ อยู่เสมอ โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อโรคซึ่งมีการขยายพันธุ์ตลอดเวลา ระหว่างที่มีการขยายพันธุ์ก็อาจจะมีการผ่าเหล่าเป็นเชื้อโรคตัวใหม่ ซึ่งการผ่าเหล่าก็เป็นไปตามทฤษฎีวิวัฒนาการของ ชาลส์ ดาร์วิน นั่นเอง ทั้งนี้ สาเหตุของการกลายพันธุ์ นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่หากเชื้อโรคที่กลายพันธุ์ แล้วสามารถอยู่รอด และขยายพันธุ์ต่อไปอีกได้ ก็หมายถึงจะมีเชื้อก่อโรคนิวพันธุ์ใหม่เกิดขึ้น トラบที่การกลายพันธุ์ยังดำเนินต่อไปโรคนิวพันธุ์ใหม่ก็อาจจะเกิดขึ้นมาอีกเป็นภัยร้ายต่อมนุษย์ในอนาคต

แม้ในปัจจุบันจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย แต่ยาปฏิชีวนะเท่าที่มีอยู่ในปัจจุบันนี้เชื่อว่าจะไม่เพียงพอในการใช้ยา เนื่องจากยาบางกลุ่มนั้นยังมีผลข้างเคียงต่อมนุษย์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว เช่น Penicillin V นั้นมีความเสี่ยงต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไวเกิน หรือบางชนิดอาจมีอันตรายต่อดับและไตของผู้ป่วยในระยะยาว รวมทั้งอาจเกิดการแพ้ยาในบางราย รวมทั้งการดื้อยาซึ่งอาจทำให้การรักษาด้วยยาชนิดเดิมหรือปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผล ซึ่งการเพิ่มขนาดของตัวยานั้นอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้ ซึ่งการดื้อยานี้ก็จะเกิดจากการใช้ยาคิดต่อกันเวลานานหรืออาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของโรค จึงนับว่าการค้นคว้าและพัฒนาด้วยชนิด ใหม่ ๆ นั้นเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดีในการรับมือกับโรคร้ายต่าง ๆ ที่จะเกิดขึ้นกับมนุษย์

โครงการพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อที่จะศึกษาแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยตัวอย่างเป็นดินที่ได้มาจากป่าพรุ เนื่องจากเป็นป่าที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก และมีลักษณะหลายประการที่เหมาะสมต่อการศึกษาแอคติโนมัยซีทส์เช่น เป็นป่าที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง และการที่มีสภาพดินที่เป็นกรดนั้นอาจทำให้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ ๆ หรือสายพันธุ์ที่หายาก อาจนำไปสู่การค้นพบสารสำคัญใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาในด้านอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งความก้าวหน้าในวงการแพทย์อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดิน และศึกษาการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค
2. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นของแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดลอกมาแล้วโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสในช่วง 16S rDNA gene รวมทั้งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินในเขตป่าพรุ
2. ทำการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดลอกมาแล้ว ตลอดจนลักษณะทางจีโนมไทป์บางลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดลอกมาแล้ว
3. ทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดลอกมาแล้ว

1.4 ประโยชน์และผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้
2. สามารถรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้เพื่อไปเป็นข้อมูลในการศึกษาและวิจัยด้านอื่นต่อไป
3. การวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ชนิดใหม่ซึ่งสามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ชนิดใหม่ได้

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ
 - 1.1 การเก็บตัวอย่าง
 - 1.2 การแยกเชื้อ
 - 1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น
2. การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ
 - 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ การเจริญ สรีระวิทยา และชีวเคมี
 - 2.2 ลักษณะทางชีวเคมี และสรีระวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

2.3.1 การสกัด DNA

2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rRNA gene

2.3.3 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic Analysis)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยซีทส์

แอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในอันดับ *Actinomycetales* และมีลักษณะกำลังระหว่างราและแบคทีเรียดังนี้

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่คล้ายแบคทีเรีย (งามนิจ, 2537)

มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกันคือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร ส่วนที่ขาดออกเป็นท่อนๆ (fragment) จะมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium* และ *Coryform* ไม่ว่าจะเป็นรูปร่าง การติดสีข้อม และลักษณะทางสรีระวิทยา ถูกทำลายได้โดยแบคทีเรียโอฟาจและสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย (antibacterial) แต่ไม่ถูกทำลายโดยสารปฏิชีวนะประเภทที่ใช้ทำลายเชื้อรา (antifungal) ผนังเซลล์ไม่มีโคตินหรือเซลลูโลสแต่ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลและกรดอะมิโน ซึ่งคล้ายกับแบคทีเรียแกรมบวก

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่คล้ายรา (Martin, 1930)

เส้นใยของแอคติโนมัยซีทส์จะแตกกิ่งก้านคล้ายรา แอคติโนมัยซีทส์หลายกลุ่มสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งตรงปลายจะมีโคนิเดีย (conidia) คล้ายกับเส้นใยและสปอร์ของรา การเจริญของแอคติโนมัยซีทส์ในอาหารเหลวมักไม่ปรากฏความขุ่น (turbidity) อันเนื่องมาจากการแขวนลอยของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวเช่นเดียวกับการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากแอคติโนมัยซีทส์มีการเจริญเป็นกลุ่มก้อน การเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยซีทส์จะคล้ายกับรา ต่างกับแบคทีเรียซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณ (exponential) (งามนิจ, 2537)

แม้ว่าแอคติโนมัยซีทส์จะมีลักษณะที่ก้ำกึ่งระหว่างแบคทีเรียกับรา แต่มีลักษณะบางประการซึ่งสามารถใช้ในการสังเกตและแยกแยะโดย

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่ต่างจากแบคทีเรียคือ

ลักษณะโคโลนี กล่าวคือโคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะใส เป็นวงกลม ผิวและขอบของโคโลนีเรียบ ส่วนของแอคติโนมัยซีทส์ โคโลนีมีลักษณะทึบ เป็นวงกลมเช่นเดียวกันแต่ผิวและขอบของโคโลนีขรุขระไม่เรียบ(Martin, 1930)

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทส์ที่ต่างจากรา(Martin, 1930)

แอคติโนมัยซีทส์เป็นโปรคาริโอต (prokaryote) คือไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เส้นใย (hypha) ของแอคติโนมัยซีทส์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 0.5 – 1.0 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าเส้นใยของราซึ่งมีขนาดถึงประมาณ 3-8 ไมโครเมตร

แอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ภายในดินทั้งหมด (ยกเว้นสกุล *Actinomyces*) และต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ส่วนมากสืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว คู่ หรือต่อเป็นสายยาว อยู่บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ และบางสกุลอาจสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงซึ่งห่อหุ้มสปอร์ไว้ที่เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium)

แอกติโนมัยซีทส์ส่วนใหญ่ไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ (photosynthetic) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (saprophyte) โดยอาศัยการย่อยสลายอินทรีย์สารต่าง บางชนิดทำให้ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Mycobacterium leprae* สาเหตุของโรคเรื้อน และ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรค และยังมีชนิดอื่นๆ ซึ่งก่อโรคในพืชและสัตว์ แต่แอกติโนมัยซีทส์ที่พบในดินส่วนใหญ่มักไม่มีอันตราย บางชนิดจะดำรงชีวิตร่วมกับพุ่มไม้และต้นไม้ใหญ่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน

2.1.2 ปริมาณและการแพร่กระจาย

ปริมาณของแอกติโนมัยซีทส์ที่พบในดินนั้นมีปริมาณค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยมีปริมาณใกล้เคียงหรือน้อยกว่าแบคทีเรียเล็กน้อย จากการประเมินปริมาณแอกติโนมัยซีทส์ในดินโดยวิธี plate count อาจนับปริมาณได้ $10^5 - 10^8$ propagules / g soil นอกจากบนดินแล้ว ยังสามารถพบ แอกติโนมัยซีทส์ได้มากตามบริเวณกองปุ๋ยหมัก ในดินน้ำขัง ใต้ทะเลสาบ และพบแม้ในกระทั่งหน้าดินที่ลึกมากๆ โดยทั่วไปมักพบแอกติโนมัยซีทส์ในบริเวณทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์สูงกว่าในดินที่ทำการเกษตรกรรม และดินในเขตแห้งแล้งมักพบแอกติโนมัยซีทส์ในบริเวณมากกว่าดินในเขตชุ่มชื้น (Coyne, 1960) ทั้งนี้ จำนวนของแอกติโนมัยซีทส์จะขึ้นอยู่กับสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบนิเวศ และแอกติโนมัยซีทส์จะมีจำนวนลดลงเมื่อความลึกของดินเพิ่มขึ้น แต่จะพบจุลินทรีย์ชนิดอื่นแทน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต จึงทำให้เจริญได้ไม่ดีในดินที่มีความชื้นสูงๆ (85 - 100 % ของความจุความชื้น) เนื่องจากจะมีปริมาณของออกซิเจนที่ลดลงตามไปด้วย แม้ว่าแอกติโนมัยซีทส์ทนสภาวะความแห้งแล้งได้ไม่ดึกดำบรรพ์แต่สปอร์ของแอกติโนมัยซีทส์นั้นสามารถทนต่อสภาวะความแห้งแล้งได้ดี ซึ่งเมื่อผ่านสภาวะที่แห้งแล้งไป ร้อยละ 30 - 90 ของ แอกติโนมัยซีทส์จะสามารถคืนสภาพได้ซึ่งต่างจากโปรคาริโอตอื่นๆ ซึ่งจะสร้างสปอร์หลังจากมีความชื้นที่เหมาะสม แอกติโนมัยซีทส์จะพบในดินในเขตร้อนมากกว่าดินในเขตหนาว แต่ไม่ได้หมายความว่าแอกติโนมัยซีทส์จะเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญนั้นจะอยู่ในช่วง 28 - 37 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 - 65 องศาเซลเซียส

แอกติโนมัยซีทส์สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดี ซึ่ง 95 % เป็นการค้นพบในดินที่มีสภาวะที่เป็นด่าง แต่ในทางตรงกันข้ามแอกติโนมัยซีทส์นั้นไม่ทนต่อสภาวะกรด ซึ่งเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 นั้นอาจเหลือเพียง 1 % ซึ่งสามารถนำหลักการนี้ไปใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแอกติโนมัยซีทส์โดยการปรับดินให้มีสภาวะที่เป็นกรด เช่น โรค potato scab ซึ่งเกิดจาก *Streptomyces scabies*

จำนวนของแอกติโนมัยซีทส์จะเพิ่มเมื่อมีปริมาณของอินทรีย์สารในดินเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในดินที่มีสารอาหารที่สามารถนำไปใช้ได้มากการแข่งขันจะสูงพบว่าแอกติโนมัยซีทส์กลับไม่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มจำนวน แต่แอสโคสปอร์สามารถใส่แหล่งคาร์บอนที่มีความซับซ้อนสูงๆได้ เช่น ไลติน เซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลสได้

2.1.3 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อแอสโคสปอร์ (ไพร์นั พิมพ์ศิริกุล, 2546)

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของแอสโคสปอร์ในดินส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน ความเป็นกรด่างของดินรวมทั้งสภาพทางกายภาพของดิน ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อแอสโคสปอร์มีดังนี้

2.1.3.1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน

เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานที่สำคัญของแอสโคสปอร์ และในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุนั้นแอสโคสปอร์จะเป็นพวกที่เข้าย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ต่อจากกลุ่มของพวกแบคทีเรียและรา โดยเฉพาะในส่วนของสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยากหรือมีความคงทนทานต่อการสลายตัวได้เป็นอย่างดี

2.1.3.2 ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน

แอสโคสปอร์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH ดินระหว่าง 6.5-8.0 ถ้า pH ของดินต่ำลงจะมีผลทำให้การดำเนินกิจกรรมหยุดชะงักได้ เช่น pH ของดินต่ำกว่า 5.0 จะทำให้ปริมาณของ *Streptomyces* ชะงักการเจริญ

2.1.3.3 ความชื้นของดิน

แอสโคสปอร์ทนสภาพแห้งแล้งได้โดยเฉพาะ conidia ของแอสโคสปอร์ทนต่อสภาพขาดน้ำและแห้งแล้งได้ดี และเนื่องจากแอสโคสปอร์เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการเจริญในสภาพที่มีออกซิเจน ถ้าดินมีความจุความชื้นของน้ำของดินสูง จะพบว่าแอสโคสปอร์เจริญอยู่น้อย

2.1.3.4 อุณหภูมิในดิน

แอสโคสปอร์ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีช่วงอุณหภูมิระหว่าง 28-37 องศาเซลเซียส และจากการทดลองเพิ่มอุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อแอสโคสปอร์พบว่าจะมีการเจริญสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

2.1.3.5 ฤดูกาลและความลึกของดิน

ซึ่งเป็นผลเกี่ยวข้องกับความชื้น และการระบายอากาศของดินที่มีผลต่อแอสโคสปอร์นั่นเอง อีกทั้งยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับปริมาณอินทรีย์วัตถุจากรากและเศษใบไม้ของพืชที่อยู่ในดินในแต่ละช่วงของฤดูกาลด้วยเช่น ในฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง พบปริมาณแอสโคสปอร์ในดินมาก ในขณะที่ในฤดูหนาวและฤดูร้อนพบปริมาณแอสโคสปอร์น้อย

2.1.4 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทส์ (ไพร์ตัน พิมพีศิริกุล, 2546)

2.1.4.1 ย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์คาร์บอน

แอกติโนมัยซีทส์มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีความคงทนต่อการย่อยสลายได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการเข้าย่อยสลายต่อจากแบคทีเรียและรา โดยจีโนม *Streptomyces* มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ chitin ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ *Norcadia* นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบพวก paraffin, phenol, steroid และ pyrimidines ได้ดี ส่วนจีโนม *Micromonospora* นั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบจำพวก cellulose, chitin, glucoside, pentosan และ lignin ได้เป็นอย่างดี

2.1.4.2 เพิ่มปริมาณ humus ในดิน

ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายอินทรีย์สารที่มีอยู่ในดินทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์

2.1.4.3 แปรสภาพสารประกอบอินทรีย์ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทส์ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile ซึ่งเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลางคือระหว่าง 25-35 °C แต่มีบางพวกเช่น *Thermoactinomyce* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-65 °C

2.1.4.4 ช่วยควบคุมประชากรจุลินทรีย์

แอกติโนมัยซีทส์บางชนิดสามารถผลิตสารพิษ หรือเอนไซม์ออกมาย่อยสลายแบคทีเรียและเชื้อราได้

2.1.4.5 ตรึงไนโตรเจนโดยการอยู่ร่วมกับพืชบางชนิด

ตั้งแต่ช่วงปลายปี 1970 เป็นต้นมาพบว่า แอกติโนมัยซีทส์สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้โดยอยู่ร่วมกับพืชหลายชนิดส่วนใหญ่เป็นไม้ในเขตอบอุ่นประเภทไม้เนื้ออ่อน และยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่ออยู่ร่วมกับรากข้าวในนาที่มีน้ำขังไม่จำเพาะเจาะจงเหมือนไรโซเบียมกับรากถั่วเท่านั้น

2.1.4.6 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แอกติโนมัยซีทส์ส่วนใหญ่หรือประมาณ 3 ใน 4 ของทั้งหมดที่มีอยู่ในดินมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ หรือสารที่มีความสามารถในการกำจัดยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ได้ ซึ่งสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่ผลิตขึ้นมา ได้แก่ streptomycin, chloramphenicol, chlortetracycline, oxytetracyclin และ cycloheximide เป็นต้น ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารได้อีกหลายชนิด เช่น สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช สารต่อต้านมะเร็ง และสารควบคุมศัตรูพืชได้ จากข้อมูลพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ

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

โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอกติโนมัยซีทส์สามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์

<i>Streptomycetaceae:</i>		<i>Thermomonosporaceae:</i>	
<i>Streptomyces</i>	~8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatosporia</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์ (ต่อ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 การแยกเพื่อคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์จากตัวอย่างดิน

การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์เพื่อให้ได้ผลดีขึ้นจะต้องมีการกำจัดการเจริญหรือการกระจายตัวของราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจทำได้โดยการควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นการแยก *Streptomyces* โดยใช้ starch casein agar (Kuster และ Willium, 1964) หรือการเติมสารบางอย่างลงไปเช่น การเติม sodiumpropionate 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Crooke และคณะ 1950) หรือการเติม cycloheximide 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Takefumi และคณะ 2004)

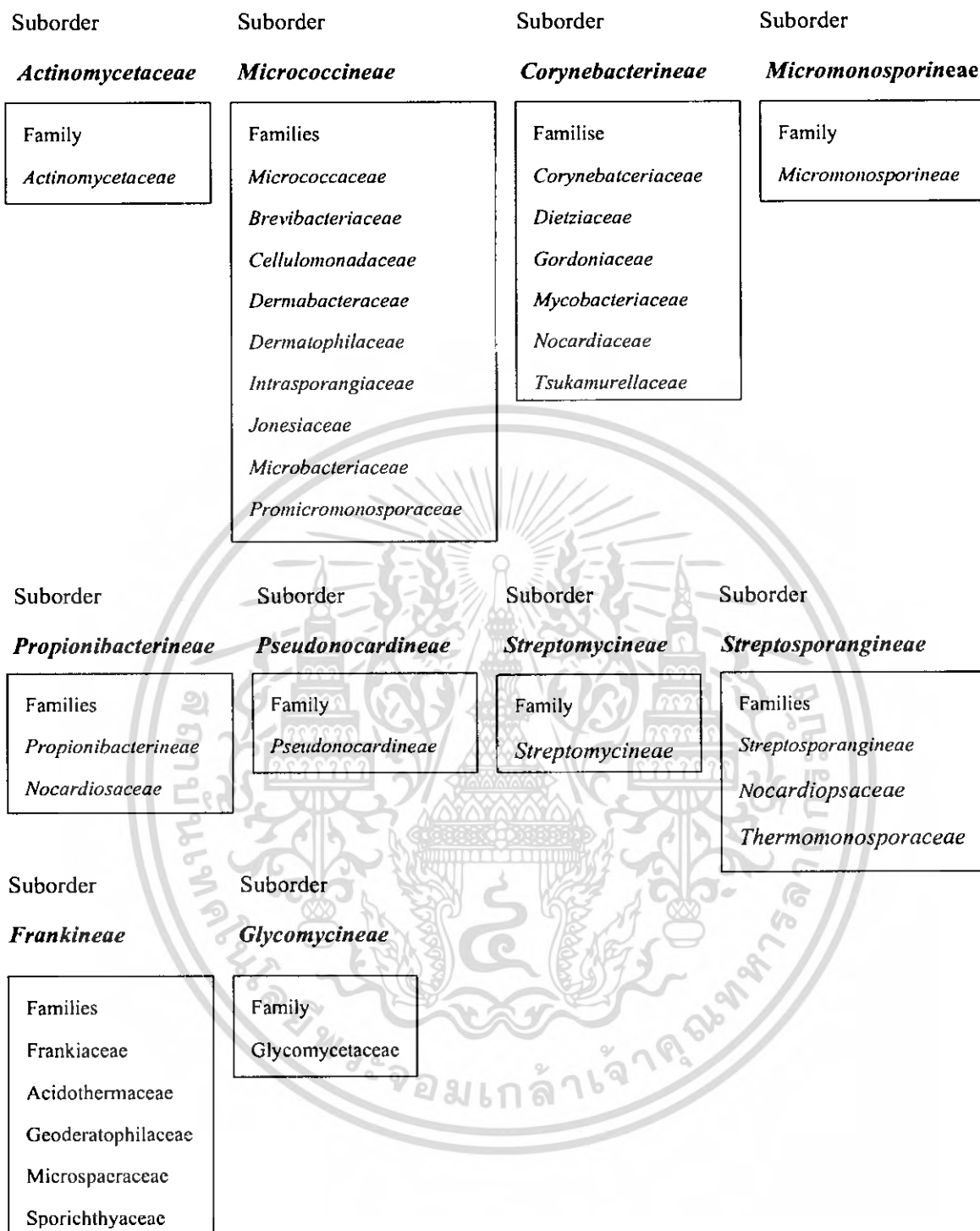
2.1.6 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิธีการที่ใช้ในการแยกจุลินทรีย์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ได้แก่ crowded plate techniques (Waskman, 1959) ใช้ตรวจหาจุลินทรีย์ในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยสังเกตบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) หรือวิธีที่นิยมกันอย่างมากคือ cross streak plate (Waskman, 1959) ซึ่งวิธีนี้เชื้อแอกติโนมัยซีทส์และเชื้อที่ต้องการทดสอบจะเจริญบนอาหารชนิดเดียวกันเพราะฉะนั้นต้องเลือกอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อทั้งสอง

2.1.7 การจัดจำแนก (Classification) (stackebrandt, 1997)

โดยทั่วไปจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) เช่น เส้นใย ชนิดของโคนิเดีย สปอร์แรงเจียเป็นต้น หรืออาจใช้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (Cell chemistry) ซึ่งสำหรับแอกติโนมัยซีทส์อาจใช้ระบบ polyphasic taxonomy (Colwell, 1970) อันประกอบไปด้วยสามวิธีใหญ่ ๆ คือ การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomy) การทำ DNA-DNA reassociation และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ซึ่งการใช้สามวิธีนี้ร่วมกันจะให้ผลที่มีความแม่นยำ

ในอดีตมีแอกติโนมัยซีทส์ซึ่งยังไม่ได้จัดกลุ่มเป็นจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันเป็นที่ชัดเจนว่าในดินนั้นประกอบไปด้วยจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละจีโนส ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นอันดับ (family) ได้ดังนี้



รูปที่ 1 แสดงการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทส์ (stackebrandt, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

สารปฏิชีวนะหมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยซีทส์ สารที่ผลิตขึ้นได้นี้สามารถไปยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือไปมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆ ได้โดยใช้ในปริมาณน้อย ดังนั้นสารปฏิชีวนะเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มยาค้านจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจุลินทรีย์นั่นเอง

ปัจจุบันจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ (ยากึ่งสังเคราะห์ หมายถึง สารที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับวิธีผลิตตามธรรมชาติ) ที่ใช้สารปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย

ในปี ค.ศ. 1940 ก่อนที่สารปฏิชีวนะจะได้รับการพัฒนามีแอคติโนมัยซีทส์เพียง 5 สกุลเท่านั้นที่พบว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้แต่ปัจจุบันพบว่ามีแอคติโนมัยซีทส์กว่า 80 สกุลแล้วที่สามารถผลิตแอคติโนมัยซีทส์ได้ เช่น *Streptomyces* ผลิตได้สูงที่สุดคือ ร้อยละ 80.2 เช่น Streptosporin จาก *S. Griseus* , Chloramphenicol จาก *S. Venezuela*, Aureomycin และ tetracycline จาก *S. aureofaciens*, *Micromonospora* ร้อยละ 6 และสกุลอื่นๆ เช่น *Actinoplanes* , *Actinomadura* , *Streptosporangium* , *Chamae* , *Nocardia* เป็นต้น ซึ่งปัจจัยที่ผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะนั้นได้แก่ องค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟตอินทรีย์ (Inorganic phosphate) แร่ธาตุ สารพรีเคอร์เซอร์ (Precursors) สารชักนำ สารยับยั้ง เป็นต้น และรวมไปถึงสภาวะต่างๆ ในการหมัก เช่น pH อุณหภูมิ ออกซิเจน เป็นต้น สารปฏิชีวนะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. Bacteriocidal antibiotics เป็นสารพวกที่ฆ่าหรือทำให้เกิดการแตกสลายของแบคทีเรียที่เข้าทำลาย เช่น เพนิซิลลิน (Penicillin)
2. Bacteriostatic antibiotics เป็นพวกที่ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของแบคทีเรีย เช่น คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)

2.2.1 การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน สามารถจำแนกได้หลายแบบและเพื่อสะดวกแก่การศึกษาหรือเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ สามารถจำแนกได้ คือ

2.2.1.1 การจัดจำแนกตามลักษณะโครงสร้าง (Tortora และคณะ, 1992 และ Alcamo, 1994)

1 Penicillin

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Thiazolidine Ring และ Beta-Lactam Ring ทำปฏิกิริยารวมกันเป็นนิวเคลียสของ Penicillin เรียกว่า 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ชนิดของ Penicillin จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่ง side chain ของ Beta-Lactam เช่น ถ้าตำแหน่ง side chain เป็น Benzyl group มีชื่อเรียกว่า Penicillin G ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Penicillin V, Penicillin F เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 Cephalosporin

มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานคล้ายกับ Penicillin ต่างกันที่ Cephalosporin มี Dihydrothiazine Ring แทน Thiazolidine Ring เมื่อรวมกับ Beta-Lactam ได้เป็นนิวเคลียสของ Cephalosporin เรียกว่า 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Cephalothin, Cefamandole และ Cefataxime

3 Aminoglycoside

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย Amino Sugar เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Streptomycin, Neomycin และ Gentamycin

4 Tetracycline

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย Benzene Ring 4 Ring เป็น Hydronaphthacene Nucleus สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Minocycline, Oxytetracycline และ Chlortetracycline

5 Chloramphenicol

มีโครงสร้างพื้นฐานแบบ ไนโตรเบนซีน (Nitrobenzene)

6 Macrolides

มีโครงสร้างพื้นฐานแบบ Macrocyclic Lactone Ring มี Lactone เชื่อมต่อกับ น้ำตาล หรือแอลกอฮอล์มี Carbon Atom มากกว่า 20 ตัวขึ้นไป ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Erythromycin, clarithromycin และ Azithromycin

7 Polypeptide

มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Bacitracin และ Polymyxin B

8 Vancomycin

เป็นกลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลใหญ่มาก มีมวลโมเลกุลประมาณ 3,500 ประกอบด้วย น้ำตาล และกรดอะมิโนที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอน

9 Polyene

กลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีพันธะคู่หลายพันธะเป็นองค์ประกอบตัวอย่าง เช่น Nystatin และ Amphotericin

10 Rifamycin

มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย Aromatic Ring เชื่อมต่อกันด้วย Aliphatic Bridge มีอนุพันธ์ คือ Rifampin

11 Griseofulvin

มีโครงสร้างเป็นแบบ Spirocyclic Structure

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12 Lincomycin

มีโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน เชื่อมต่อกับ Amino Sugar ที่เชื่อมต่อกับซัลเฟอร์

2.2.1.2 การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะตามขอบเขตในการทำลาย

ในการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทราบถึงการออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 พวก คือ

1 Broad-spectrum Antibiotics

คือสารปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียแกรมบวก รปร่างกลมแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ เช่น Chloramphenicol และ Tetracyclines

2 Intermediate-spectrum Antibiotics

คือสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวก รปร่างกลม แบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่ม Mycobacteria เช่น Streptomyces, Gentamycin, Kanamycin และ Neomycin

3 Narrow-spectrum Antibiotics

คือสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายจุลินทรีย์พวกใดพวกหนึ่ง โดยอาจทำลายเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก หรือแกรมลบ เช่น Penicillin G, Erythromycin และ Lincomycin

2.2.1.3 การจัดจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์

การออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะสามารถพบได้ 2 แบบ คือ สารปฏิชีวนะที่มีผลในการฆ่าเชื้อได้โดยตรง (Bacteriocidal) และที่มีผลในการยับยั้งการเจริญโดยจุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (Bacteriostatic) สารปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการทำลายเชื้อของจุลินทรีย์ได้ต่างกัน ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มด้วยกันคือ

1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย Macromolecular Net Work ที่เรียกว่า เปปติโดไกลแคน ซึ่งสารดังกล่าวพบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น โดยสารปฏิชีวนะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญ เช่น Penicillin และ Cephalosporin จะป้องกันการเกิด Crosslink ของเปปติโดไกลแคน ในขณะที่ Bacitracin และ Vancomycin ยับยั้งการทำงานของ Peptidoglycan Synthetase ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Peptidoglycan Backbone ของผนังเซลล์ ดังนั้นเมื่อโครงสร้างของผนังเซลล์มีความอ่อนแอไม่สมบูรณ์ เซลล์จึงถูกย่อยสลายได้ที่สุด สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ host น้อยมาก โดยเฉพาะมนุษย์เนื่องจากเซลล์ของมนุษย์ไม่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ออกฤทธิ์ทำลายพลาสมาเมมเบรน

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม Polypeptide ทำให้ความสามารถในการนำสารเข้าออกของพลาสมาเมมเบรนเปลี่ยนแปลง เช่น Polymyxine, Colistin, Nystatin, Amphotericin B และ Streptomycin ทำให้คุณสมบัติที่เป็น Selective Permeability เสียไปหรือทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์หรือคุณสมบัติการเป็น Osmotic Barrier เสียไป

3 ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งพวกโพรคาริโอต และยูคาริโอต พบว่าไรโบโซมจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนในโพรคาริโอต ไรโบโซมเป็นชนิด 70s ไรโบโซมประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยคือ 50s และ 30s unit สารปฏิชีวนะชนิด Cloramphenicol ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่ง 50s คือยับยั้งการสร้างพันธะเปปไทด์ของสาย Polypeptide Erythromycin ออกฤทธิ์บริเวณ 50s และ 70s ribosome เช่นเดียวกัน โดยป้องกันการเกิด Translocation-movement ของ mRNA tetracycline ยับยั้งการรวมกันของ tRNA ที่มีกรดอะมิโนกับไรโบโซมป้องกันการค่อกันของกรดอะมิโน เพื่อเป็นสายโซ่ Polypeptide สารปฏิชีวนะกลุ่ม Amino glycoside เช่น Gentamycin และ Streptomycin จะทำให้รูปร่างของ 30s ของ 70s ไรโบโซมเปลี่ยนแปลง ทำให้การอ่านรหัสของยีนบน mRNA ไม่ถูกต้องมีผลในการสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติ

4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดนิวคลีอิกในการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าบางชนิด เช่น Antiviral Idoxuridine มีข้อจำกัดในการใช้สูง เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วน Rifamycin, Nalidixic acid และ Trimethopim เป็นสารปฏิชีวนะที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเลือกออกฤทธิ์ทำลาย

5 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารทุติยภูมิ

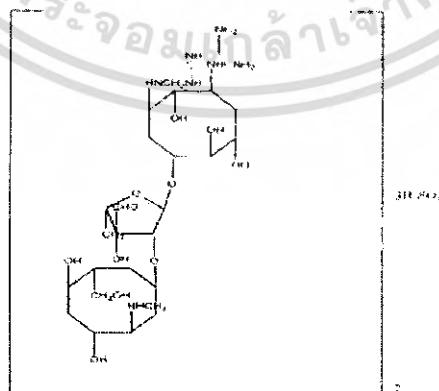
สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารทุติยภูมิที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ เช่น Sulfonamides, Trimethoprim และ Isoniazid สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักมีกลไกการออกฤทธิ์ขัดขวาง โดยการแย่งแย่งที่กัน (Competive inhibition) โดยอาศัยสูตรโครงสร้างที่คล้ายกัน เช่น Sulfonamides มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ para-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งเป็นสารที่เชื่อจำเป็นต้องนำไปใช้ในการสังเคราะห์ Folic Acid หรือ Trimethoprim และ Pyrimethamine มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ Pteridine Portion ของ Dihydrofolate ออกฤทธิ์ขัดขวางเอนไซม์ Dihydrofolate Reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน Dihydrofolic Acid ไปเป็น Tetrahydrofolic Acid

2.2.2 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่เชื้อแอกติโนมัยซิสผลิต เช่น

2.2.2.1 Streptomycin

Streptomycin sulfate มีลักษณะสีขาวไม่มีกลิ่นเป็นผง และเกิดปฏิกิริยากับความชื้นได้อย่างรวดเร็วแต่จะไม่เกิดปฏิกิริยากับแสงและอากาศแต่จะสามารถละลายน้ำได้ดี และถ้าหากอยู่ในรูปสารละลายจะเป็นกรดเล็กน้อยหรือเป็นกลางละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ แต่จะไม่สามารถละลายได้เลยในตัวทำละลายอินทรีย์ หากพบว่าอยู่ในรูปสารละลายในน้ำสารสามารถทำการเก็บได้เลขที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยที่ไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติต่างๆของสารไป แต่จะมีความเสถียรมากถ้าทำการเก็บที่พีเอช 4.5 ถึง 7.0 และจะมีการเสถียรภาพได้เมื่อได้รับความร้อน และถ้าต้องการที่จะทำการฆ่าเชื้อสามารถทำได้โดยการนำน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วมาผสมรวมกับ Streptomycin ซึ่งจะอยู่ในรูปที่เป็นผงที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว โดยที่ตัวผง Streptomycin นั้นจะมีความปนเปื้อน ซึ่งเป็นสิ่งที่ยากในการกำจัดออกและแต่จะสามารถทำการกำจัดออกได้โดยการใส่แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) จะสามารถนำเอาความปนเปื้อนออกมาได้ซึ่งจะทำให้ Streptomycin ที่ได้มีความเสถียรและสามารถทำการเก็บรักษาได้ง่าย

จุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิต Streptomycin ได้คือ *Streptomyces griseus* และยังสามารถทำการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้อีก เช่น Hydroxystreptomycin, Mannisidostreptomycin และ Cycloheximide แต่เป็นสารที่ไม่ได้รับความสนใจมาก และในทางการแพทย์โดยที่ Streptomycin A จะใช้เรียกแทน Streptomycin และ Streptomycin B ใช้เรียกแทน Mannisidostreptomycin โดยที่ Hydroxystreptomycin จะแตกต่างจาก Streptomycin ตรงที่จะมี Hydroxy group ตรงตำแหน่งของ Hydrogen ตำแหน่งที่ 1 ของ Methyl group บนน้ำตาล Streptose Methyl group และ Mannisidostreptomycin จะมีหมู่ Mannose ที่เกาะกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกตรงที่ Hydroxy group ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 4 และหมู่ n-methyl-L-glucosaminic



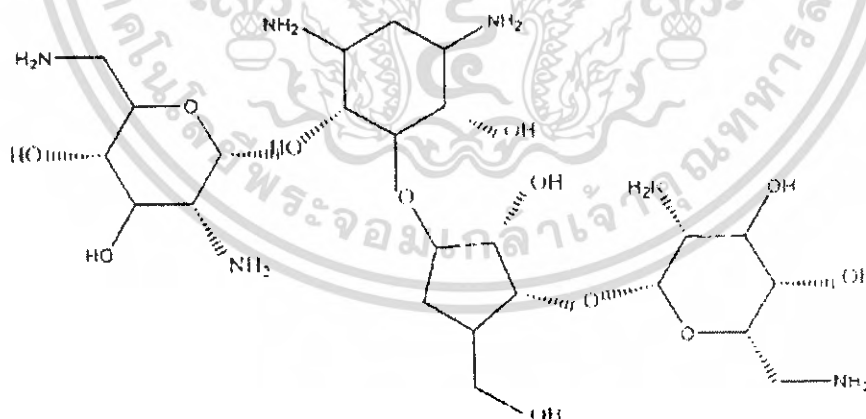
รูปที่ 2 แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Streptomycin

ที่มา : <http://www.rxlist.com/cgi/generic2/streptomycin.htm>

2.2.2.2 Neomycin

ในการค้นหาสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษน้อยกว่า Streptomycin นั้นได้มีการค้นพบ Neomycin ในปี ค.ศ. 1949 โดยค้นพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิตได้คือ *Streptomyces fradiae* จากนั้นเป็นต้นมา Neomycin เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน Neomycin เป็นสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการทำการรักษาการติดเชื้อภายในทางเดินอาหาร การติดเชื้อที่เนื้อเยื่อต่างๆ และนอกจากนี้ยังใช้ในการผ่าตัด โดยจะช่วยในการลดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยที่ Neomycin จะมีผลต่อแบคทีเรียหลายชนิดและมีความเป็นพิษที่ต่ำและจะไม่ทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน และจะถูกดูดซึมได้เพียงเล็กน้อยภายในทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายโดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงอื่นๆ

Neomycin จะอยู่ในรูปของเกลือซัลเฟต โดยที่จะมีสีขาวหรือเป็นผลึกสีเหลืองที่มีลักษณะเป็นผง และสามารถละลายน้ำได้ดี เพราะมีคุณสมบัติเป็น Hydroscopic สูง และสามารถเกิดปฏิกิริยากับแสงได้อย่างรวดเร็ว แต่จะมีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้างและสามารถนำไปฆ่าเชื้อได้ และ 60 เปอร์เซ็นต์ ของ Neomycin จะเป็น Free Base จุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิต Neomycin ได้คือ *Streptomyces fradiae* โดยที่ Neomycin จะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน โดยที่จะมีสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ Neomycin คือ Neamine, Neomycin A, B, C นอกจากนี้ *Streptomyces fradiae* ยังสามารถทำการผลิตสารปฏิชีวนะอื่นๆ ได้อีกเช่น Fradycin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรีย



รูปที่ 3 แสดงรูปทาง โครงสร้างทางเคมีของ Neomycin

ที่มา : <http://www.epochem.com/products/pharm/1405-10-3.htm>

2.2.2.3 Paromomycin

มีการค้นพบ Paromomycin ในปี ค.ศ. 1956 โดยที่จะมีการผลิตได้โดย *Streptomyces* sp. PD 0499 โดยผลิตจาก *Streptomyces rimosus* โดยพบ *Streptomyces rimosus* จากการเก็บตัวอย่างในประเทศโคลัมเบียอย่างไรก็ตาม Paromomycin มีความคล้ายคลึงกับ Neomycin และ Streptomycin ในเรื่องของ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า Oxytetracyclin ซึ่งผลิตได้โดย *Streptomyces rimosus* เช่นกัน

โครงสร้างทั่วไปของ Paromomycin ได้มีการรายงานจากการใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เราจะพบว่า Paromomycin จะประกอบด้วยสองส่วนคือ Paromomycin I และ Paromomycin II และสูตรโครงสร้างที่แน่นอนของ Paromomycin มีการค้นพบและได้รับการยืนยัน โดยการใช้เทคนิค Mass Spectrometric โครงสร้างของ Paromomycin จะประกอบด้วย D-Glucose แทน 6-Amino-6-Deoxy-D-Glucosamine ซึ่งจะพบใน Neomycin B โดยที่ความคล้ายกันของโครงสร้างนี้จะพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างสาร Paromomycin II กับ Neomycin C โดยที่ Paromomycin มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้กว้างและจะนิยมใช้ในการรักษาอาการเกี่ยวกับการติดเชื้อในทางเดินอาหารที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อโดยพวก *Salmonella*, *Shigella* และจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆที่อยู่ภายในทางเดินอาหารเช่น *Escherichia coli* อย่างไรก็ตามในการใช้ก็จะต้องระวังเนื่องจากการใช้ Paromomycin กับการติดเชื้อในทางเดินอาหารและจะพบได้ว่า Paromomycin นั้นสามารถละลายได้ดีในน้ำและมีความเสถียรต่อความร้อนและช่วงของพีเอชที่กว้าง

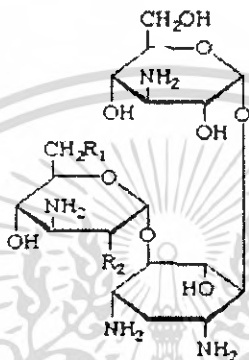
2.2.2.4 Kanamycin sulphate

Kanamycin สามารถทำการคัดแยกได้ในปี ค.ศ. 1957 โดยทำการคัดแยกออกจาก *Streptomyces* โดยที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพกับแบคทีเรียพวก Mycobacteria และแบคทีเรียต่างๆภายในลำไส้ซึ่ง Kanamycin มีการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียหลายชนิดจึงเป็นที่สนใจในการศึกษามากกว่าสารปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในเวลาอันสั้น Kanamycin จึงเป็นสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญและได้รับความนิยมนำมาใช้ในการรักษาต่างๆ

การวิจัยเกี่ยวกับกิจกรรมต่างๆของ Kanamycin นั้นจะมุ่งเน้นไปที่โครงสร้างของ Kanamycin ซึ่งจะมีการตรวจสอบออกมาโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีและการตรวจสอบ จะพบว่า *Streptomyces kanamyceticus* จะมีการสร้างสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันคือ Kanamycin A, B และ C และ Kanamycin บริสุทธิ์ที่พบในท้องตลาดนั้นจะเป็น Kanamycin A ซึ่งเป็นชนิดที่เป็นพิษน้อยที่สุดโดยที่ Kanamycin แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตรงที่ชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลที่จับอยู่กับ Glycosidic Oxygen ที่ตำแหน่งของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ Central Deoxystreptamine สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ Kanamycin คือ Neomycin และ Paromomycin โดยปกติแล้ว Kanamycin จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งกรดและเบส ภายในช่วงพีเอชที่ 2-11 โดยเฉพาะการติดเชื้อที่มาจากแบคทีเรียแกรมลบต่างๆ เช่น *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* และ *Enterobacter* ซึ่งจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเชื้อที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ดี และจะนิยมใช้ Kanamycin ในการเป็นสาร Antiseptic ก่อนทำการผ่าตัดต่างๆ แต่ Kanamycin จะดูดซึมได้น้อยมากภายในลำไส้ ในการใช้งานควรที่จะทำการฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อของผู้ป่วย แต่ถ้าในกรณีที่มีการติดเชื้อรุนแรงนั้นจะทำการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ และจะไม่นิยมใช้ Kanamycin ในการรักษาวัณโรค เนื่องจากเชื้อ *Mycobacterium* นั้นสามารถทำการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 4 แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Kanamycin

ที่มา : <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/emzyme/glossary/kanamyc.html>

2.2.2.5 Amikacin

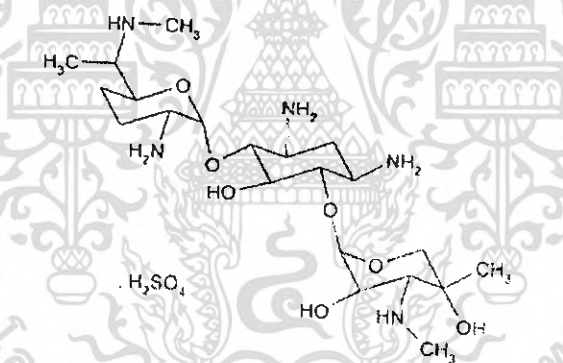
Amikacin มีการใช้ครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น โดยจัดเป็นสารในกลุ่ม Semisynthetic Aminoglycoside โดยที่จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะพวก Bacilli โดยที่โครงสร้างของ Amikacin นั้นแบบที่เป็น L-Amikacin จะสามารถทำงานได้ดีกว่าแบบที่เป็น D-Amikacin และนอกจากนี้ Amikacin ยังสามารถทำการต้านทานต่อเอนไซม์ต่างๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ซึ่งแตกต่างจากสารปฏิชีวนะชนิดอื่นเช่น Gentamicin และ Tobramycin แต่ Amikacin ก็ยังไม่สามารถต้านทานต่อเอนไซม์ Aminotransferase และ Acetylases จากการศึกษานี้ในขั้นต้นจะพบว่า Amikacin นั้นจะมีความเป็นพิษที่น้อยกว่า Kanamycin และ Gentamicin อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วการใช้ Amikacin ในปริมาณมากนั้นมักจะใช้เพื่อเป็นการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแกรมลบพวก Bacilli นั้น Amikacin จะเป็นสารปฏิชีวนะที่ได้รับความนิยมในการใช้มากกว่าสารปฏิชีวนะพวก Aminoglycoside อื่นๆ

2.2.2.6 Gentamicin

Gentamicin ทำการคัดแยกได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 ซึ่งได้มีการผลิตเป็นการค้าโดยจะใช้แบคทีเรียพวก *Micromonospora purpurea* และ Gentamicin จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียพวก *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมลบพวก Bacilli ได้ดีเป็นพิเศษ Gentamicin จะนิยมใช้ในการรักษาในอาการติดเชื้อทางผิวหนังต่างๆ โดยจะใช้ในลักษณะที่เป็นครีมหรือยาขี้ผึ้ง แต่อย่างไรก็ตาม Gentamicin นั้นยังมีความสามารถที่จำกัดเมื่อเทียบ Neomycin ในการใช้ในการรักษาขบวนการรักษากับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่เราจะนิยมใช้ Gentamicin ในการรักษาอาการติดเชื้อที่เกิดในแผลต่างๆและถ้าหากมีการติดเชื้อในกรณีที่น่ารุนแรงนั้นเราจะทำให้การใช้ Gentamicin ในรูปของเหลวโดยทำการผสม Gentamicin 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการรักษาอาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Serratia* sp. สาเหตุที่นิยมใช้ Gentamicin เนื่องมาจากว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถทำการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดก่อนๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่หลากหลายชนิด

Gentamicin นั้นจะลักษณะเป็นผงสีขาวจนถึงสีเหลือง สามารถละลายได้ดีในน้ำแต่จะไม่มาละลายได้เลยในแอลกอฮอล์และเบนซีน และจะมีความเสถียรที่พีเอชที่กว้างและไม่สามารถนำไปเข้าเครื่อง Autoclave ได้



รูปที่ 5 แสดงรูปทางโครงสร้างทางเคมีของ Gentamicin

ที่มา : <http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1.LKT-G1658.450.4.1.html>

2.2.2.7 Tobramycin sulfate

มีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 สามารถทำการผลิตได้จาก *Streptomyces tenebrarius* คุณสมบัติที่สำคัญของ Tobramycin คือ จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะพวก Gentamicin ได้จะไม่สามารถต้านทานต่อ Tobramycin ได้ โครงสร้างของ Tobramycin นั้นจะมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ Kanamycin B

ที่จะทำการใช้ภายในเวลาสี่สิบสี่ชั่วโมงเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้อย่างช้าๆ และในกานใช้นั้นควรที่จะฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อของผู้ป่วย Spectinomycin นั้นเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถออกฤทธิ์ได้กับจุลินทรีย์หลายชนิดโดยที่จะมีฤทธิ์คือแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยที่ Spectinomycin นั้นจะออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ rRNA กับไรโบโซม ในขั้นตอนในการสังเคราะห์โปรตีน แต่จะไม่มีผลต่อการอ่านลำดับเบส แต่ Spectinomycin นั้นจะได้รับความนิยมน้อยกว่าว่าสารปฏิชีวนะอื่นๆ เนื่องจากเป็นสารที่มีราคาสูงแต่จะได้รับความนิยมในการนำไปรักษาในผู้ป่วยโรคหนองใน เนื่องจากผู้ป่วยบางรายจะแพ้ต่อยา Penicillin



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์

เครื่องแก้วต่าง ๆ	บริษัท Pyrex < USA
ตู้ปลอดเชื้อ	รุ่น UV - 126 บริษัท International scientific supply, Thailand
กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Olympus, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Sanyo รุ่น Falcon บริษัท Thaipolymedie CO.,LTD.,Thailand
หม้อนึ่งความดันไอ	HIRAYAMA รุ่น KICLAVE, Japan
เครื่องวัดค่า pH	EUTECH INSTRUMENT P4510,USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius, Germany
ตู้บ่มเชื้อ	รุ่น BE 600 บริษัท Memmert, Germany
ตู้อบไอร้อน	รุ่น LUE 600 บริษัท Memmert, Germany
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	บริษัท Memmert, Germany

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง การแยก และการคัดเลือกเชื้อ

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณรากไม้และดินทั่วไปในธรรมชาติที่มีลักษณะที่น่าสนใจ ทำการเก็บตัวอย่างดินประมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัดพีเอชของดินตามวิธีของ Enokita (Enokita และคณะ, 1986)

3.2.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora และคณะ, 1995) นำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน คูดสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี 1.5 % Phenol ละลายใน Phosphate buffer พีเอช 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนปรับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที คูดสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร คูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร Humic acid – vitamin agar ที่ผสมสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะ (nystatin, nalidixic acid และ cycloheximide) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เลือกลงโคลนที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – malt extract agar จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเอียง (slant) เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3.2.1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเฉียงยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่ผลิตได้ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Streptococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดกับโคลนของเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ และเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1–2 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

3.2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ (Morphological and cultural characteristics)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shirling และ Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1971)

3.2.2.2 ลักษณะทางชีวเคมี และ สรีระวิทยา (Biochemical and Physiological Characteristics)

1. การใช้แหล่งคาร์บอน

Basal agar medium เตรียมโดยใช้ ISP (Shirling และ Gottlieb, 1996) และเติม Casanmino acid ลงไป จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อปรับเข้มข้นประมาณ 1 % หลังจากการนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คนส่วนผสมที่ได้เทส่วนที่ผสมลงไป 25 มิลลิลิตร บนจานเพาะเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยแหล่งคาร์บอนทดสอบที่สำคัญ ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

No carbon source	negative Control
D-glucose	positive Control
D-mannitol	D-ribose
L-rhamnose	D-melibiose
Raffinose	Glycerol
Inocltal	Salicin
Lactose	D-galactose
L-arabinose	Cellubiose
D-fructose	

ในการเตรียมหัวเชื้อจากอาหารเลี้ยง (slant) yeast-malt extract ทำได้โดยล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และถ่ายเชื้อลงไปหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว สารละลายเซลล์แขวนลอย จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสที่ได้ออกจากส่วนที่ตกตะกอนนำไปทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยอีกครั้ง ที่ได้ในน้ำกลั่น แยกส่วนใสที่ได้ 2 ครั้ง เติมน้ำกลั่นลงไปในส่วนที่ตกตะกอน เพื่อรักษาปริมาตรเดิมไว้ หัวเชื้อที่ได้นำมาใช้ในการทดสอบการใช้คาร์บอน งานเพาะเชื้อที่ไม่มีหัวเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หัวเชื้อปริมาณ 1 ลูกป นำมาขีดตามขวางบนผิวของอาหารบนงานเพาะเชื้อ การลงเชื้อบนงานเพาะเชื้อ จะทำซ้ำ 2 ครั้ง และบ่มไว้ที่ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 14 วัน ตรวจสอบโดยเปรียบเทียบการเจริญ หรือการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ตัวควบคุม 2 ชนิดด้วยกัน คือ เจริญบนอาหาร Basal agar medium และเจริญบนอาหาร Basal agar medium ที่มีกลูโคสรวมอยู่ด้วย

การอ่านผลการทดลองมีดังนี้

1. มีการใช้แหล่งคาร์บอน (+) เมื่อมีการเจริญเติบโตบนอาหาร Basal agar medium มากกว่าการเจริญเติบโตบน Basal agar medium ที่ปราศจากคาร์บอนเลย แต่บางครั้งน้อยกว่าการเจริญเติบโตบน Basal agar medium ที่มีกลูโคสรวมอยู่
2. มีการใช้แหล่งคาร์บอนไม่ชัดเจนนัก (\pm) เมื่อมีการเจริญเติบโตบน Basal agar medium มากกว่าบน Basal agar medium ที่ปราศจากคาร์บอนเพียงเล็กน้อยและน้อยกว่าการเจริญเติบโตบน Basal agar medium ที่มีกลูโคส
3. ไม่มีการใช้คาร์บอน (-) เมื่อมีการเจริญบน Basal agar medium ใกล้เคียงหรือน้อยกว่าการเจริญบน Basal agar medium ที่ปราศจากคาร์บอน

2. การย่อยสลายเจลาติน

เลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลตลงบนอาหาร Bouillon Gelatin Broth ในหลอดทดลอง (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน หลอดทดลองที่ใส่เชื้อไว้จะนำมาเปรียบเทียบกับหลอดทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยบ่มหลอดทดลองทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินเกิดขึ้นจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

3. การย่อยสลายในเตรท

เลี้ยงเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลตลงบนอาหารเหลวเปปโตนโพแทสเซียมในเตรท (Peptone KNO₃ broth) (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 6 วัน ในวันที่ 4 ถ่ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟานิลิกลงไป 2 หยด และ N,N-dimethyl-1-naphthylamine solution 3 หยด ถ้ามีไนไตรท์เกิดขึ้น สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง

4. การตกตะกอนและการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม

เลี้ยงเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลตใน Skim milk 10 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมกับน้ำกลั่นบ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น น้ำนมจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใส ถ้ามีการตกตะกอนของโปรตีน จะเกิดการตกตะกอนในน้ำนม

5. การเจริญในอาหารความเข้มข้นของเกลือปริมาณต่าง ๆ

ฉีดเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลต ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YMA (ISP Medium No.2) ซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 % 1.5 % 3% 4% 5% 6% และ 7 % จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน แล้วบันทึกผลการเจริญที่ความเข้มข้นที่เชื้อสามารถเจริญได้

6. การเจริญของที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ฉีดเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลต ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YMA (ISP Medium No.2) จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 , 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน แล้วบันทึกผลอุณหภูมิ ที่เชื้อสามารถเจริญได้

7. การเจริญของเชื้อในระดับความเป็นกรดต่าง ๆ

ฉีดเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ทุกไอโซเลต ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YMA (ISP Medium No.2) ที่มีการปรับพีเอชให้เป็น 4 , 4.5 , 5 , 6 , 7 และ 8 จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน แล้วบันทึกผลการเจริญที่พีเอชที่เชื้อสามารถเจริญได้

3.2.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

1. การสกัด DNA

เลี้ยงเชื้อแอสติโนมัยซีทส์ในอาหารเหลว Yeast extract - malt extract ที่เติมไกลซีน ร้อยละ 0.1 0.3 โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 – 3 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ล้างเอกซเตรนนี้เป็นเอกซเตรนที่สังวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ด้วย saline-EDTA 2 ครั้งจากนั้นเติม 10 mM Tris-HCL และ Lysozyme เพื่อทำลายผนังเซลล์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม Tris-SDS 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำปรับ อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คกตะกอนโปรตีนด้วย phenol:chloroform เขย่าเบา ๆ 10 นาทีเพื่อให้คกตะกอนทั่วถึง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเติม 99% เอทานอล (แช่เย็น) ประมาณ 2/3 ของสารละลาย ทั้งหมด คนด้วยแท่งแก้ว (Spooling) ล้างด้วย 70% และ 99% เอทานอลตามลำดับ จากนั้น รอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง คน DNA ที่พันอยู่ในแท่งแก้ว ใส่ 1xSSC ใส่หลอดทดลองแล้วปิดปาก หลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้ DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ RNase TI และ RNase A เพื่อทำลาย RNA ที่เหลือหลังจากนั้นทำตามขั้นตอนการสกัดเช่นเดิม

2. การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABIPRISM BigDye Terminator CYCLE Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) (DNA technology กำแพงแสน) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST n program และ alignment software (ในกรณี CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic tree ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดิน 6 ตัวอย่าง

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดิน 6 ตัวอย่าง จากป่าพรุ จังหวัดพะเยา ซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าของดินอยู่ในช่วงพีเอช 4-6 สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้ 25 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างดินบริเวณป่าพรุ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และรหัสเชื้อที่สามารถแยกได้

รหัสตัวอย่าง	สถานที่	ค่าความเป็นกรดค่าของดิน	รหัสเชื้อ
PY3	จ.พะเยา	5.70	3-15
			3-21
PY5	จ.พะเยา	6.30	5-126
			5-131
			5-133
			5-135
PY6	จ.พะเยา	6.21	6-71
			6-74
PY8	จ.พะเยา	4.57	8-4
			8-7
			8-151
			8-157
			8-162
			8-170
PY9	จ.พะเยา	5.52	9-19
			9-20
			9-28
			9-30
			9-32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ตัวอย่างคินบริเวณป่าพรุ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และรหัสเชื้อที่สามารถแยกได้ (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	สถานที่	ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	รหัสเชื้อ
PY9	จ.พะเยา	5.52	9-37
			9-38
			9-41
			9-45
			9-50
			9-52

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ในจำนวนเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ที่คัดแยกได้ทั้ง 25 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อส่วนมากไม่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ มีเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *M. luteus*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ 13, 13, 22, 12 และ 18 ไอโซเลต ตามลำดับ ในจำนวนเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ทั้ง 25 ไอโซเลตนั้น มีอยู่ 5 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง(ม.ม.)					
	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albican</i>
PY9-19	45	60	60	42	52	45
PY9-20	37	22	60	4.5	40	40
PY9-28	37	60	52	43	41	47
PY9-30	-	16	-	-	30	-
PY9-32	-	10	-	-	28	-
PY9-37	-	15	-	-	02	-
PY9-38	-	06	-	-	25	-
PY9-41	-	14	-	-	10	-
PY9-45	55	60	60	60	55	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง(ม.ม.)					
	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albican</i>
PY9-50	41	26	50	35	42	24
PY9-52	55	48	43	29	37	21
PY8-4	-	03	05	-	04	-
PY8-7	-	04	06	-	03	-
PY8-151	55	60	-	-	55	-
PY8-157	55	60	-	-	55	-
PY8-162	55	60	-	-	55	-
PY8-170	55	60	-	-	55	-
PY6-71	-	-	-	46	-	-
PY6-74	-	-	-	51	-	-
PY5-126	-	02	03	-	-	-
PY5-131	-	03	03	-	-	-
PY5-133	22	15	10	20	03	-
PY5-135	-	-	-	13	-	-
PY3-15	55	60	40	25	31	-
PY3-21	55	60	32	10	-	-

หมายเหตุ

E. coli = *Escherichia coli* ATCC 25922

Ps.aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

M.luteus = *Micrococcus luteus* ATCC 9341

S.aureus = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

B.subtilis = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

C.albican = *Candida albicans* ATCC 10231

4.3 ลักษณะทางฟิโนไทป์ของเชื้อที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด 25 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ พบว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้เป็นส่วนใหญ่ จากนั้นจึงนำเชื้อทั้ง 25 ไอโซเลตไปศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน โดยทำการศึกษาลักษณะต่างๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 ลักษณะการเจริญและทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดเลือก

ลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring และ Gottlieb, 1966) ตรวจสอบโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute)

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	รงควัตถุ
PY9-19	Y.M.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	เทา
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	เทา
	Gly.A.	ดีมาก	ดำเทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทาดำ	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	ดำ
	P.I.A.	ดี	เทา	ขาว	-
PY9-20	Y.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	เทา
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ดีมาก	ดำเทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	ดำ
	P.I.A.	ดี	เทา	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของ เส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของ เส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY9-28	Y.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	เทา
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ดีมาก	ดำเทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	ดำ
	P.I.A.	ดี	เทา	ขาว	-
PY9-30	Y.M.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ม่วงเทา	ขาว	ม่วงอ่อนๆ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ม่วงอ่อน	-
	Gly.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	ม่วง	ม่วง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	ม่วง	ม่วง	-
	P.I.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
PY9-32	Y.M.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ม่วงเทา	ขาว	ม่วงอ่อนๆ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ม่วงอ่อน	-
	Gly.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	N.A.	ดี	ม่วง	ม่วง	-
	P.I.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทสับอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY9-37	Y.M.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ม่วงเทา	ขาว	ม่วงอ่อนๆ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ม่วงอ่อน	-
	Gly.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	ม่วง	ม่วง	-
	N.A.	ดี	ม่วง	ม่วง	-
	P.I.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
PY9-38	Y.M.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ม่วงเทา	ขาว	ม่วงอ่อนๆ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ม่วงอ่อน	-
	Gly.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	ม่วง	ม่วง	-
	N.A.	ดี	ม่วง	ม่วง	-
	P.I.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
PY9-41	Y.M.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ม่วงเทา	ขาว	ม่วงอ่อนๆ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ม่วงอ่อน	-
	Gly.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	ม่วง	ม่วง	-
	N.A.	ดี	ม่วง	ม่วง	-
	P.I.A.	ดี	ม่วงอ่อน	ม่วงอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY9-45	Y.M.	ดี	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
PY9-50	N.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
	Y.M.	ดี	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	ดำ
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	N.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
PY9-52	Y.M.	ดี	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เทา	ขาว	-
	N.A.	ดี	ขาว	ขาว	ดำ
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซิท์สบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	ติรงควัตถุ
PY8-4	Y.M.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	O.M.	ดีมาก	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
	I.S.	น้อย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	T.A.	ดีมาก	เหลือง	น้ำตาลอ่อน	-
	Gly.A.	ดีมาก	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Glu.A.	ดีมาก	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Cz.sucrose	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดี	น้ำตาล	น้ำตาล	-
PY8-7	P.I.A.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	Y.M.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	O.M.	ดีมาก	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	-
	I.S.	น้อย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	T.A.	ดีมาก	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลอ่อน	-
	Gly.A.	ดีมาก	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Glu.A.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	N.A.	ดี	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	P.I.A.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
PY8-151	Y.M.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอ่อนๆ	ขาว	-
	Gly.A.	ดี	เหลือง	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	P.I.A.	ดี	เหลือง	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	ถึงรควัดดู
PY8-157	Y.M.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	Gly.A.	ดี	เหลือง	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	P.I.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
PY8-162	Y.M.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	Gly.A.	ดี	เหลือง	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	P.I.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
PY8-170	Y.M.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	เหลืองอ่อนๆ	ขาว	-
	Gly.A.	ดี	เหลือง	ขาว	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดีมาก	เหลืองสด	เหลืองสด	-
	P.I.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและต้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY6-71	Y.M.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ดำ	ดำ	-
	Gly.A.	ดีมาก	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
PY6-74	Y.M.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	O.M.	ดี	ขาว	ขาว	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ดำ	ดำ	-
	Gly.A.	ดี	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เหลืองอ่อน	ขาว	-
	N.A.	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
PY5-126	Y.M.	ดีมาก	เทาขาว	เหลือง	-
	O.M.	ดีมาก	ขาวดำ	เหลืองเข้ม	-
	I.S.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	T.A.	ดีมาก	เหลืองเข้ม	เหลืองเข้ม	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทาขาว	เขียวเหลือง	เทา
	Glu.A.	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	Cz.sucrose	ดี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	-
	N.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY5-131	Y.M.	ดีมาก	เทาขาว	เหลือง	-
	O.M.	ดีมาก	ขาวดำ	เหลืองเข้ม	-
	I.S.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	T.A.	ดีมาก	เหลืองเข้ม	เหลืองเข้ม	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทาขาว	เขียวเหลือง	เทา
	Glu.A.	ดีมาก	เทาขาว	เหลือง	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	ดีมาก	เทาขาว	เหลือง	-
PY5-133	Y.M.	ดี	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	เทาเขียว	เทา	-
	I.S.	ดีมาก	น้ำเงินแกมเขียว	น้ำตาล	-
	T.A.	ดีมาก	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	-
	Gly.A.	ดีมาก	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทาเขียว	น้ำตาล	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	N.A.	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ดีมาก	เทาเขียว	เหลืองอ่อน	-
PY5-135	Y.M.	ดีมาก	ขาว	แดง	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	แดง	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ดีมาก	ดำเทา	เทา	-
	Gly.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	ขาว	แดง	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	แดงอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซิท์สบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	อาหาร	การเจริญ	ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ	ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PY3-15	Y.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	เขียวเข้ม	ขาว	-
	I.S.	ดีมาก	เทาเขียว	เทา	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	เทา
	P.I.A.	ดี	ขาว	ขาว	-
PY3-21	Y.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ดีมาก	เทาเขียว	เทา	-
	T.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	-
	Glu.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดีมาก	เทาขาว	ขาว	-
	N.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	เทา
	P.I.A.	ดีมาก	ขาว	ขาว	-

หมายเหตุ Y.M. = Yeast extract malt extract agar

T.A = Tyrosine agar

Cz. Sucrose = Czapek sucrose agar

O.M. = Oatmeal agar

Gly. A = Glycerol – Asparagines agar

N. A. = Nutrient agar

I. S. = Inorganic salt starch agar

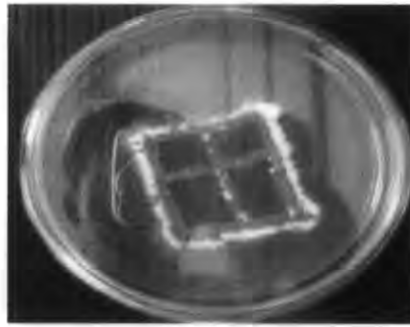
Glu. A = Glucose – Asparagines agar

P. I. A. = Peptone iron agar

จากการทดสอบสีของเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหารเมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร ISP ชนิดต่างๆสามารถจัดเชื้อเป็นกลุ่มได้ 8 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซิท์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีดำและเส้นใยอาหารสีขาว เชื้อในกลุ่มนี้มี 6 ไอโซเลต ได้แก่ PY9-19, PY9-20, PY9-28, PY9-45, PY9-50 และ PY9-52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงลักษณะ โคโลนิของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY9-19

เชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิด และสามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส รวมทั้งสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม และเจลาตินได้นอกจากนี้เชื้อแอสคิโนมัยซีทส์กลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ ในขณะที่ไอโซเลต PY9-28 ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนเตรท แสดงดังตารางที่ 6 และ 7

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 1

Isolate no.	NaCl tolerance							pH tolerance				Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Patronization			Coagulation
PY9 19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	-	+	-	+	±
PY9 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	-	+	-	+	±
PY9 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-	+	+	+	-	+	-	+	-
PY9 45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	-	+	-	+	+
PY9 50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	-	+	-	+	±
PY9 52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	-	+	-	+	±

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 1

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ					
	PY9-19	PY9-20	PY9-28	PY9-45	PY9-50	PY9-52
D-mannitol	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose	+	+	+	±	+	+
D-melibiose	+	+	+	+	+	+
D-raffinose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	±	+	+	±	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	±	+	+
D-Galactose	+	±	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = positive reaction

- = negative reaction

± = weakly reaction

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีม่วง มี 5 ไอโซเลตได้แก่ PY9-30, PY9-32, PY9-37, PY9-38 และ PY9-41 ซึ่งสามารถสร้างรงควัตถุสีม่วง



รูปที่ 9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY9 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้เกือบทุกชนิดยกเว้น D-mannitol, D-raffinose และ Cellobiose ส่วนแหล่งคาร์บอน L-rhamnose มี 2 ไอโซเลตที่สามารถใช้ได้ คือ PY9-30 และ PY9-32 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 และสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-6 อีกทั้งยังสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ยกเว้น 2 ไอโซเลต ได้แก่ PY9-37 และ PY9-38 ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มนี้ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แสดงดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 2

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance					Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation		
PY9 30	+	+	+	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	-	-	-	+	+	-
PY9 32	+	+	+	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+	-	+	-
PY9 37	+	+	+	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
PY9 38	±	+	+	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
PY9 41	+	+	+	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 9 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 2

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ				
	PY9 - 30	PY9 - 32	PY9 - 37	PY9 - 38	PY9 - 41
D-mannitol	-	-	-	-	-
D-ribose	±	+	+	+	+
L-rhamnose	+	+	-	-	-
D-melibiose	+	+	+	+	+
D-raffinose	-	-	-	-	-
Glycerol	±	±	+	±	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 2
(ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ				
	PY9 - 30	PY9 - 32	PY9 - 37	PY9 - 38	PY9 - 41
Salicin	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-
D-fructose	+	±	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = positive reaction

- = negative reaction

± = weakly reaction

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลและไม่สร้างเส้นใยอากาศ เชื้อในกลุ่มนี้มี 2 ไอโซเลต ได้แก่ PY8-4 และ PY8-7



รูปที่ 10 แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY8-7

เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิดยกเว้น ไอโซเลต PY8 4 ที่ไม่สามารถใช้ L-rhamnose, D-fructose และ D-xylose ได้ และยังสามารถเจริญบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ ร้อยละ 3 เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในช่วงที่เอชระหว่าง 4-6 ตลอดจนสามารถเจริญได้ใน อุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศา เชื้อในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนในเครทเป็นไนไตรท์ แสดงดังตารางที่ 10 และ 11

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 3

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance					Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation		
PY8 4	+	+	±	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
PY8 7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-

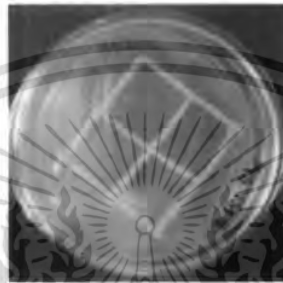
ตารางที่ 11 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 3

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ	
	PY8-4	PY8-7
D-mannitol	+	+
D-ribose	+	+
L-rhamnose	-	+
D-melibiose	+	+
D-raffinose	±	+
Glycerol	+	+
Salicin	±	+
Lactose	+	+
D-galactose	+	+
L-arabinose	+	+
Cellobiose	±	+
D-fructose	-	+
D-xylose	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศและสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง มี 6 ไอโซเลต ได้แก่ PY8-151, PY8-157, PY8-162, PY8-170, PY6-71 และ PY6-74



รูปที่ 11 แสดงลักษณะ โคลนิจของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY8-170

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ไอโซเลต คือ PY8-157 และ PY8-162 ไม่สามารถใช้ D-mannitol , D-raffinose, Salicin , และ Cellobiose ได้ ส่วน PY8-151 ไม่สามารถใช้ D-raffinose และ Cellobiose ได้ และ PY8-170 ไม่สามารถใช้ Cellobiose ได้ เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 ส่วน ไอโซเลต PY8-151, PY8-157, PY8-162 และ PY8-170 เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 อีกทั้งสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-6 ยกเว้น ไอโซเลต PY6-71 ที่สามารถเจริญในช่วงพีเอช 4-8 และสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ยกเว้น PY6-71 และ PY6-74 ซึ่งสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส เชื้อในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ ยกเว้น ไอโซเลต PY8-151 และ PY8-157 ที่ไม่สามารถย่อยโปรตีนจากนม ไอโซเลต PY8-157 และ PY6-74 ที่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ เชื้อส่วนใหญ่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ยกเว้น ไอโซเลต PY8-151 และ PY8-162 ที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แสดงดังตารางที่ 12 และ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 4

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance						Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation			
PY8 151	±	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	±	
PY8 157	±	+	+	+	-	-	-	-	±	+	+	-	-	+	±	-	-	-	+	-	-	
PY8 162	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+	-	±	+	
PY8 170	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	
PY6 71	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	-	+	-	
PY6 74	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	

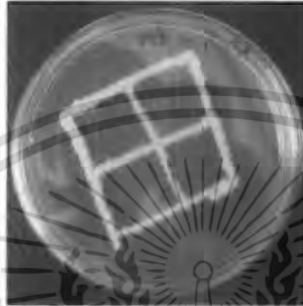
ตารางที่ 13 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 4

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ					
	PY8-151	PY8-157	PY8-162	PY8-170	PY6-71	PY6-74
D-mannitol	+	-	-	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose	+	±	-	+	+	+
D-melibiose	+	+	+	+	+	+
D-raffinose	-	-	-	+	+	+
Glycerol	+	+	-	+	+	+
Salicin	+	-	-	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารเป็นสีขาว เชื้อในกลุ่มนี้มี 2 ไอโซเลต ได้แก่ PY3-15 และ PY3-21



รูปที่ 12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY3-15

เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้นไอโซเลต PY9-45 ไม่สามารถใช้ L-rhamnose และ Glycerol ได้ และสามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 ยกเว้น PY5-131 ที่เจริญบนความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส ยกเว้น PY5-131 ที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม และเจลาตินได้ โดยทุกไอโซเลตยกเว้น PY5-131 สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แสดงดังตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 14 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 5

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance					Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation		
PY3 15	±	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
PY3 21	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 5 (ต่อ)

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance					Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation		
PY9 52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	±
PY5 131	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

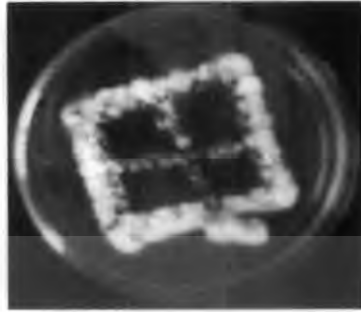
ตารางที่ 15 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 5

แหล่งคาร์บอน	รหัสดูเชื้อ	
	PY3 15	PY3 21
D-mannitol	+	+
D-ribose	+	+
L-rhamnose	+	+
D-melibiose	+	+
D-raffinose	+	+
Glycerol	+	+
Salicin	+	+
Lactose	+	+
D-galactose	+	+
L-arabinose	+	+
Cellobiose	+	+
D-fructose	+	+
D-xylose	+	+

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาและสร้างเส้นใยอาหารเป็นสีเหลือง เชื้อในกลุ่มนี้มี 2 ไอโซเลต ได้แก่ PY5-126 และ PY5-131



รูปที่ 13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY5 131

เชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิด และสามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 ยกเว้น PY5-131 ที่เจริญบนความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 และยังสามารถเจริญได้ในช่วงที่เอชระหว่าง 4-8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และเชื้อในกลุ่มนี้ยังสามารถย่อยสลาย โปรตีนในนมและเจลาตินได้ โดยไอโซเลตสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แสดงดังตารางที่ 16 และ 17

ตารางที่ 16 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 6

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance						Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation			
PY5 126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
PY5 131	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	

ตารางที่ 17 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 6

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ	
	PY5 126	PY5 131
D-mannitol	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่ง คาร์บอน	รหัสเชื้อ	
	PY5 126	PY5 131
D-ribose	+	+
L-rhamnose	+	+
D-melibiose	+	+
D-raffinose	+	+
Glycerol	+	+
Salicin	+	+
Lactose	+	+
D-galactose	+	+
L-arabinose	+	+
Cellobiose	+	+
D-fructose	+	+
D-xylose	+	+

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

กลุ่มที่ 7 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารเป็นสีแดง
 เชื้อในกลุ่มนี้มี 1 ไอโซเลต ได้แก่ PY5-135



รูปที่ 14 แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY5-131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอกติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิด และสามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 และเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม แต่ไม่สามารถเจลาตินและสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ดังแสดงในตารางที่ 18 และ 19

ตารางที่ 18 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 7

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance					Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation		
PY5 135	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	±	-	+	+	+	-	+	-	-	-

ตารางที่ 19 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 7

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ
	PY5-135
D-mannitol	+
D-ribose	+
L-rhamnose	+
D-melibiose	+
D-raffinose	±
Glycerol	+
Salicin	+
Lactose	+
D-galactose	+
L-arabinose	+
Cellobiose	+
D-fructose	+
D-xylose	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ + = positive reaction

- = negative reaction

± = weakly reaction

กลุ่มที่ 8 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาแกมเขียวและสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง เชื้อในกลุ่มนี้มี 1 ไอโซเลต ได้แก่ PY5-133



รูปที่ 15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY5-133

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในกลุ่มนี้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดสอบได้ทุกชนิด และสามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและสามารถเจลาติน รวมถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แสดงดังตารางที่ 19 และ 20

ตารางที่ 20 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ กลุ่มที่ 8

Isolate no	NaCl tolerance							pH tolerance				Growth at (°C):					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	
	1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization			Coagulation
PY5 133	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ กลุ่มที่ 8

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อ
	PY- 133
D-mannitol	+
D-ribose	+
L-rhamnose	+
D-melibiose	±
D-raffinose	+
Glycerol	+
Salicin	+
Lactose	±
D-galactose	+
L-arabinose	+
Cellobiose	+
D-fructose	+
D-xylose	+

หมายเหตุ + = positive reaction ± = weakly reaction

- = negative reaction

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางการเจริญ สรีระวิทยาและชีวเคมี การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น ได้ทำการเลือกเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์มา 2 ไอโซเลตคือ PY3-21 และ PY9-45 เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของ 16s rRNA gene พบว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY3-21 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. pseudogriseolus* subsp. *glucofermentans* DSM 40026 และ *S. griseorubens* DSM 40160 มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (%similarity) ที่ร้อยละ 99.6 (ดังตารางที่ 16) ด้วยระดับความเชื่อมั่นของค่า Bootstrap บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 79.0 และ แอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลต PY9-45 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. endus* NRRL 2339, *S. sporocinereus* DSM 41460 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* DSM 40578 มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (%similarity) ที่ร้อยละ 98.9 (ดังตารางที่ 17) ด้วยระดับความเชื่อมั่นของค่า Bootstrap บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

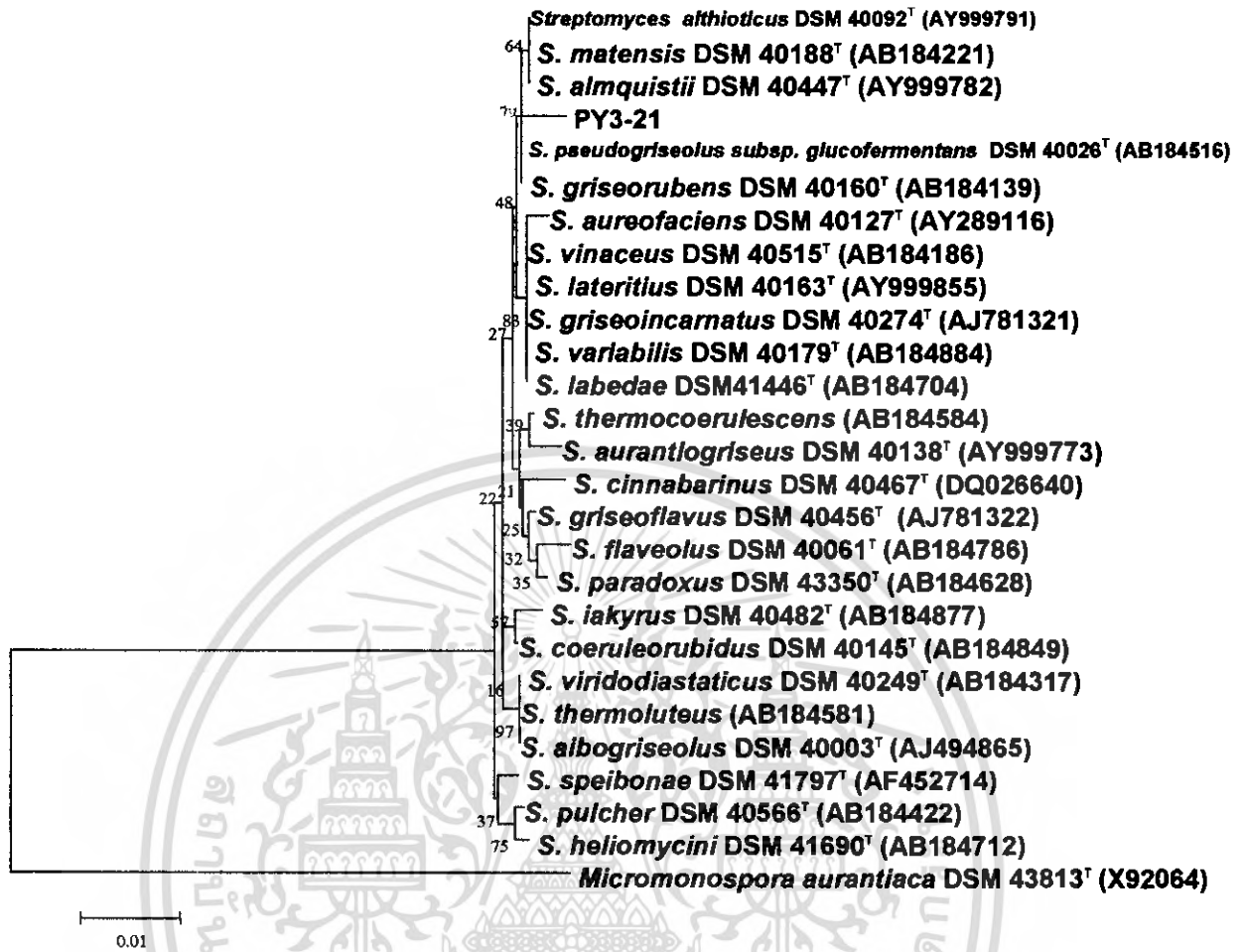
ตารางที่ 22 แสดงค่าความคล้ายคลึง (Similarity value) ของไอโซแลต PY3-21 เทียบกับชื่อ *Streptomyces* สายพันธุ์ใกล้เคียงที่สุด

ไอโซล	<i>Streptomyces viridodiateticus</i> DSM 40249 ^T	<i>S. albogriseolus</i> DSM 40003 ^T	PY3-21	<i>S. lateritius</i> DSM 40163 ^T	<i>S. aureofaciens</i> DSM 40127 ^T	<i>S. variabilis</i> DSM 40179 ^T	<i>S. vinaceus</i> DSM 40515 ^T	<i>S. griseocamatus</i> DSM 40274 ^T	<i>S. labadae</i> DSM41446 ^T	<i>S. pseudogriseolus</i> subsp. <i>glucofermentans</i> DSM 40026 ^T	<i>S. griseorubens</i> DSM 40160 ^T	<i>S. griseoflavus</i> DSM 40456 ^T	<i>S. elmquistii</i> DSM 40447 ^T	<i>Streptomyces althioticus</i> DSM 40092 ^T	<i>S. matensis</i> DSM 40188 ^T
<i>Streptomyces viridodiateticus</i> DSM 40249 ^T	100	99.9	99.2	99.6	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.6	99.5	99.4
<i>S. albogriseolus</i> DSM 40003 ^T	99.9	100	99.2	99.6	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.3	99.6	99.5	99.4
PY3-21	99.2	99.2	100	99.4	99.2	99.4	99.4	99.4	99.4	99.6	99.4	99.3	99.3	99.4	99.3
<i>S. lateritius</i> DSM 40163 ^T	99.6	99.6	99.4	100	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6
<i>S. aureofaciens</i> DSM 40127 ^T	99.4	99.4	99.2	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.6	99.3	99.6	99.5	99.4
<i>S. variabilis</i> DSM 40179 ^T	99.6	99.6	99.4	99.8	99.8	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6
<i>S. vinaceus</i> DSM 40515 ^T	99.6	99.6	99.4	99.8	99.8	99.9	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6
<i>S. griseocamatus</i> DSM 40274 ^T	99.6	99.6	99.4	99.8	99.8	99.9	100	100	99.9	99.9	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6
<i>S. labadae</i> DSM41446 ^T	99.6	99.6	99.4	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	100	99.9	99.9	99.6	99.8	99.7	99.6
<i>S. pseudogriseolus</i> subsp. <i>glucofermentans</i> DSM 40026 ^T	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.8	99.7	99.9	99.9	99.8
<i>S. griseorubens</i> DSM 40160 ^T	99.6	99.6	99.6	99.9	99.6	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.7	99.9	99.9	99.8
<i>S. griseoflavus</i> DSM 40456 ^T	99.3	99.3	99.3	99.6	99.3	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7	100	99.7	99.6	99.6
<i>S. elmquistii</i> DSM 40447 ^T	99.6	99.6	99.5	99.8	99.5	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.7	100	99.6	99.6
<i>Streptomyces althioticus</i> DSM 40092 ^T	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.3
<i>S. matensis</i> DSM 40188 ^T	99.4	99.4	99.3	99.6	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.6	99.8	99.9	100

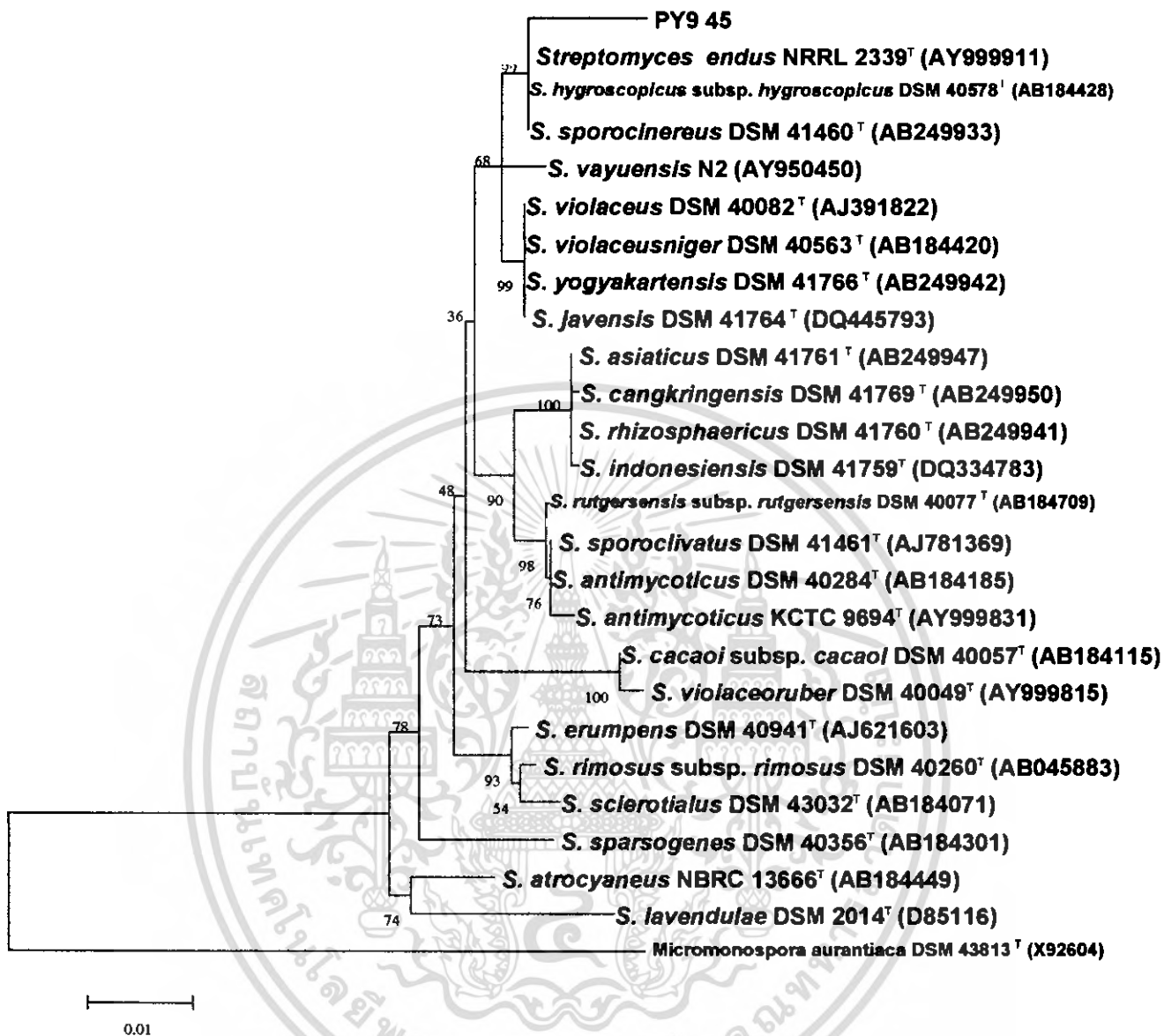
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 23 แสดงค่าความคล้ายคลึง (Similarity value) ของ โยสเตรด PY9-45 เทียบกับชื่อ *Streptomyces* สายพันธุ์ใกล้เคียงที่สุด

ชื่อ	Streptomyces erumpens DSM 40941 ^T	S. violaceoruber DSM 40049 ^T	S. antimycoticus KCTC 9694 ^T	S. sporoclivatus DSM 41461 ^T	S. rutgersensis subsp. rutgersensis DSM 40077 ^T	PY9_45	S. vayuensis N2	Streptomyces endus NRRL 2339 ^T	S. sporocinereus DSM 41460 ^T	S. hygrosopicus subsp. hygrosopicus DSM 40578 ^T	S. yogyakartaensis DSM 41766 ^T	S. violaceusniger DSM 40563 ^T	S. javensis DSM 41764 ^T
Streptomyces erumpens DSM 40941 ^T	100	98.6	98.6	98.7	98.7	97.6	98.4	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6	98.6
S. violaceoruber DSM 40049 ^T	98.6	100	98.7	98.7	99.9	98.4	99.3	99.6	99.6	99.6	99.9	98.6	99.9
S. antimycoticus KCTC 9694 ^T	98.6	98.7	100	99.9	99.9	97.7	98.4	98.8	98.8	98.8	98.7	98.7	98.7
S. sporoclivatus DSM 41461 ^T	98.7	98.7	99.9	100	99.9	97.8	98.5	98.9	98.9	98.9	98.7	98.7	98.7
S. rutgersensis subsp. rutgersensis DSM 40077 ^T	98.7	98.6	99.9	99.9	100	97.6	98.4	98.7	98.7	98.7	98.6	98.6	98.6
PY9_45	97.6	98.4	97.7	97.8	97.6	100	98.2	98.9	98.9	98.9	98.4	98.4	98.4
S. vayuensis N2	98.4	99.3	98.4	98.5	98.4	100	100	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
Streptomyces endus NRRL 2339 ^T	98.7	99.6	98.8	98.9	98.7	98.9	100	100	99.9	99.9	99.6	99.6	99.6
S. sporocinereus DSM 41460 ^T	98.7	99.6	98.8	98.9	98.7	98.9	99.3	100	100	99.9	99.6	99.6	99.6
S. hygrosopicus subsp. hygrosopicus DSM 40578 ^T	98.7	99.6	98.8	98.9	98.7	98.9	99.3	99.9	99.9	100	99.6	99.6	99.6
S. yogyakartaensis DSM 41766 ^T	98.6	99.9	98.7	98.7	98.6	98.4	99.3	99.6	99.6	99.6	100	99.9	99.9
S. violaceusniger DSM 40563 ^T	98.6	99.9	98.7	98.7	98.6	98.4	99.3	99.6	99.6	99.6	99.9	100	99.9
S. javensis DSM 41764 ^T	98.6	99.9	98.7	98.7	98.6	98.4	99.3	99.6	99.6	99.6	99.9	99.9	100



รูปที่ 16 แสดงลักษณะของ Phylogenetic trees ของเชื้อแอคติโนมัยซีทีพีไอ โซเลต PY3-21



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของ Phylogenetic trees ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์สโไซเลต PY9-45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ทั้งหมด 25 ไอโซเลตที่แยกได้จากดินตัวอย่างบริเวณป่าพรุในจังหวัดพะเยา สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ ซึ่งสามารถจัดจำแนกเชื้อได้ 8 กลุ่ม โดยเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ทั้ง 8 กลุ่ม สามารถเจริญบนอาหาร Yeast extract – malt extract (ISP medium No. 2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 7 ที่ช่วงพีเอช 4 – 7 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทุกกลุ่ม คือ 37 องศาเซลเซียส แต่มีบางไอโซเลตในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 5 และ กลุ่มที่ 7 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 ส่วนกลุ่มที่ 6 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส โดยเชื้อส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ โดยยกเว้นเชื้อในกลุ่มที่ 7 ที่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ นอกจากนี้เชื้อบางไอโซเลตในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 7 นั้นไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ในขณะที่กลุ่มอื่นๆสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้

เมื่อทำการเลือกเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ไอโซเลตที่น่าสนใจ คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพมา 2 ไอโซเลต คือ PY3-21 และ PY9-45 แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของ 16s rRNA gene พบว่า เชื้อแอสคิโนไมซีทส์ไอโซเลต PY3-21 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces pseudogriseolus* subsp. *glucofermentans* DSM 40026 และ *S. griseorubens* DSM 40160 มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (%similarity) ที่ร้อยละ 99.6 (ดังตารางที่ 16) ที่ระดับความเชื่อมั่นของค่า Bootstrap บน phylogenetic tree ร้อยละ 79.0 และสำหรับเชื้อแอสคิโนไมซีทส์ไอโซเลต PY9-45 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. endus* NRRL 2339, *S. sporocinereus* DSM 41460 และ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* DSM 40578 มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 98.9 (ดังตารางที่ 17) ที่ระดับความเชื่อมั่นของค่า Bootstrap บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99.0 แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่า เชื้อไอโซเลต PY3-21 และ PY9-45 นี้เป็นเชื้อเดียวกันกับสายพันธุ์ที่ได้กล่าวมาในเรื่องต้นหรือไม้ เพราะข้อมูลยังไม่เพียงพอในการสรุป ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบด้วยวิธี DNA-DNA hybridization และควรมีการเปรียบเทียบทางพีโนไทป์และเคโมไทป์ของเชื้อทั้งสอง (Stackebrandt and Goebel, 1994; Keswani and Whitman, 2001)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า มีเชื้อแอสคิโนไมซีทส์บางไอโซเลตสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งอาจมีแนวโน้มในการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ และหากมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาย่างต่อเนื่องก็จะสามารถพัฒนาสารนั้นให้เป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขในอนาคตต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองตัวอย่างที่ทำการเก็บมาควรทำการแยกเชื้อทันทีเพื่อประสิทธิภาพในการแยกเชื้อที่ดี

ในการทดสอบการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือซึ่งได้ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ถึง 7 ซึ่งในบางไอโซเลตยังให้ผลเป็นบวก ทั้งนี้เพื่อความถูกต้องและเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดลองควรมีความทดสอบที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นอีก จนกว่าจะแสดงผลเป็นลบ จึงจะถือว่าเป็นช่วงความเข้มข้นที่เชื้อสามารถเจริญได้อย่างแท้จริง

ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อการสกัดดีเอ็นเอพบว่า เชื้อบางไอโซเลตเจริญได้ช้ากว่าที่ควรซึ่งไม่ส่งผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ควรมีการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเหลวต่อเชื้อที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอก่อนทำการสกัด เพื่อการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยใช้ระยะเวลาที่สั้นที่สุด



เอกสารอ้างอิง

งามนิจ นนทโส. 2537. Systematic Bacteriology Laboratory. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล, 2546, จุลชีววิทยาทางดิน, กรุงเทพฯ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 21-25.

Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. The Society for Actinomycetes. Japan.

Brock, T.D., Smith, W., and Madigan, MT. 1984. Biology of Microorganisms. 4th ed. Englewood. Cliffs, Prentice Hall, Inc. New Jersey.

Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. Order *Actinomycetales*. In Cowan, S.T., Holt, J.K., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., and Ravin, A.W., Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.4. United State of America. Williams and Wilkins. Baltimore : 675-881.

Bu'Lock, J.D., Hamilton, D., Hulme, M.A., Powell, A.J., Smalley, H.M., Shepherd D., and Smith, G.N. 1975. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium uritieae*. Can. J. Microbial. 11:765-778

Cross, T. and Goodfellow, M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. 254-261. In Sykes, G., and Skinner, F.A., Actinomycetes: Characteristics and Practical Importance. Academic Press, London.

Coyne, M.S. 1999. Soil microbiology : an exploratory. Approach. International Thomson Publishing 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.

Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories. Tokyo. Japan.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. Evolution 39 : 783-791

Goodfellow, M and Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 37 : 189-216.

Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordaski, M. 1988. Actinomyces in biotechnology. Academic press Limited, London. : 501.

Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T., and Nonomura, H. 1991 (b). New methods for the
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72(5) : 320-326.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore. : 605-623.
- Iwai, Y. and Omura, S. 1982. Culture condition for screening for new antibiotics. *J. Antibiotics*. 35 : 123-141.
- Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*. In Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. *Bergey's manual of determinative bacteria*. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore. USA. : 2442-2450.
- Keswani, J. and Whitman, W.B. 2001. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int. J. syst. Evol. Microbiol.* 51 : 667-678.
- Kanoksilpatham, W. 1981. Studies and antibiotic production by *Streptomyces* and especially a *Streptoverticillium* species. Bangkok : A thesis for Master Degree of Science (Microbiology), Mahidol University.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis Software. 2001. Tempe (AZ). Arizona State University.
- Lawrence, C.H. 1956. A method of isolating actinomycetes from scabby potato tissues and Soil with minimal contamination. *Can. J. Bot.* 34 : 44-47.
- Labeda, D.P. and Shearer, M.C. 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological application. In Labeda, D.P. (ed.) . *Isolation of biotechnological organism from nature*. McGraw-Hill, USA. : 1-19.
- Lechavalier, H.A. and Lederberg, E.M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial Mutants. *J. Bacterial.* 63 : 339-406.
- Liu, C.M., McDaniel, L.E., and Schaffner, C.P. 1975. factors affecting the production of Candicidin. *Aitimicrob. Agents Chemother.* 7 : 196-202.
- Malik, V.S. and Vining, L.C. 1970. Metabolism of chloramphenicol by the production of Candicidin. *Aitimicrob. Agents Chemother.* 7 : 196-202.
- Martin, A. 1999. *Microbial Ecology : Introduction to soil microbiology*. 2th ed. 36-50.
- Matin, J.F., and Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbial. Reviews*. 44: 230-251.

- Martin, J.F. 1977. Control of antibiotics synthesis by phosphate Adv. Biochem. Eng. 6 : 105-127.
- Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method Effective for both proforontial isolation and enumeration of *Microbiospora* and *Streptosporangium* strains in soil. J. Ferment. Technol. 47 : 463-469.
- Okami, Y. and Hotta, K. 1998. Search and discovery of new antibiotics. In Goodfellow, M. Williams, S.T., and Mordarski. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London. 36-58.
- Paulus, H. 1967. Polymycins, In Gottlieb, D., and Shaw, P.D. (eds.). Antibiotics Vol. 2. Springer-Verlag, Inc. New York. 254-267.
- Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv. Appl. Microbial. 14 : 73-92.
- Schlegel, G. 1997. The system of prokaryotes. General microbiology 6th ed. 92-419.
- Shiring, E.B., and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16 : 313-340.
- Stansly, P.G. 1974. A bacterial spray apparatus useful in searching for antibiotic producing Microorganisms. J. Bacteriol. 54 : 443-445.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 846-849.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition. In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. Edited by Goodfellow, M., and O'Donnell, A.G.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., and Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface : Flexible strategies for multiple sequence aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24 : 4876-4882.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1992. Micrology, An Introduction. 4th ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. : 810.
- Waksman, S.A. 1959. The actinomycetes Vol. 1 : Nature, Occurrence and Activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 327.
- Waksman, S.A. and Henrici. 1974. Streptomycetaceae. In Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., the Williams and wilkins Company, Baltimore : 747-753.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Weinberg, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M., and Wagman, G.H. 1964. Gentamicin, a new broadspectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1963 : 1-7.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces*. In Williams, S.T., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.). *Bergey's manual of determinative bacteria*. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. : 2452-2492.
- Williams, S.T., and Cross, T. 1971. *Actinomycetes : Physiological properties*. In *Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc. London : 320.
- Williams, S.T. 1989. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol.4. United State of America : Williams and Wilkins. Baltimore : 2340-2347.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่
นี้มาเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
15 นาที ยกเว้นการเตรียมน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ความร้อนมาเชื้อที่
อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1. Sodium-caseinate agar (SCN)

Sodium caseinate	0.2	กรัม
Glucose	0.1	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.02	กรัม
MgSO ₄	0.02	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2. Yeast extract-malt extract agar (YMA), ISP medium no.2

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

pH 7.3

3. Yeast extract-malt extract broth (YMB)

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Glycine	0.1-0.3	กรัม (ขึ้นอยู่กับเชื้อที่นำมาเลี้ยง)
Distilled water	100	มิลลิลิตร

pH 7.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Nutrient agar

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

5. Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	30	กรัม
Casamino acid, Technical	1.75	กรัม
Starch	0.15	กรัม
Agar	1.7	กรัม

pH 7.3

6. Carbon utilization medium (ISP-9)

carbohydrate	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.264	กรัม
KH ₂ PO ₄ Anhydrous	0.238	กรัม
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.565	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
Pridham and Hlieb trace salts (B)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	1.5	กรัม

pH 6.8-7.0

trace salt (B)		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64	กรัม
FESO ₄ ·7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Inorganic salt-starch agar

Soluble starch	1.0	กรัม
KH_2PO_4 Anhydrous	0.1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	กรัม
CaCO_3	0.2	กรัม
Trace salt Solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม

8. Nutrient gelatin broth

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
Gelatin	10.1	กรัม

9. Skim milk broth

Skim milk (Difco)	10.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

10. Tyrosine agar

Glycerol	1.5	กรัม
L-tyrosine	0.05	กรัม
L-asparagine	0.1	กรัม
K_2KPO_4 anhydrous	0.05	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
NaCl	0.01	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Trace salt solution (A)	0.1	กรัม
Agar	2.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Humic acid – Vitamin agar (pH 7.3)

Humic acid	1	กรัม
Na_2HPO_4	0.5	กรัม
KCL	1.71	กรัม
MgSO_4	50	มิลลิกรัม
FeSO_4	10	มิลลิกรัม
CaCO_3	20	มิลลิกรัม
Vitamin B	10	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการสกัด DNA

Saline-Na₂EDTA

0.1 m NaCl

50 mM EDTA.2Na (pH 8.0)

1 M Tris-HCl pH 8.0

ละลาย tris-HCL 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้ได้ pH โดยเติม HCl เข้มข้น 42 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จึงนำไปฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9

Tris-HCL 1.21 มิลลิกรัม

Distilled water 100 มิลลิลิตร

Adjust the pH to 9 with HCl

Phenol : Chloroform (1:1 v/v)

ละลายสาร Phenol ที่อยู่ในขวด ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 65 °C และผสมกับ Chloroform ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บสารละลายในภาชนะที่ทึบแสง

RNase A solution

RNase A 20 มิลลิกรัม

0.15 M NaCl 10 มิลลิลิตร

ละลาย RNase A 20 มิลลิกรัม ใน 0.15 M NaCl 10 มิลลิลิตร และอุ่นที่ 95° C เป็นเวลา 5-10 นาที เก็บ RNase A solution ไว้ที่ 20° C

RNase T₁ solution

RNase T₁ 80 ไมโครลิตร

0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสม RNase T₁ 80 ไมโครลิตร กับ 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิลิตร และอุ่นที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บ RNase T₁ solution ไว้ที่ 20 °C



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AB184139_S._griseorubens_NBRC_
AJ781322_S._griseoflavus_LMG_1
AB184786_S._flaveolus_NBRC_371
AB184628_S._paradoxus_NBRC_148
AB184584_S._thermocoerulescens
AY999782_S._almquistii_NRRL_B-
AY999791_S._althioticus_NRRL_B
AB184221_S._matensis_NBRC_1288
AY999773_S._aurantiogriseus_NR
DQ026640_S._cinnabarinus_NRRL_
Micromonospora_aurantiaca_DSM_

CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG

AB184581_S._thermoluteus_NBRC_
AB184317_S._viridodiataticus_
AJ494865_S._albogriseolus_NRRL
AB184877_S._iakyrus_NBRC_13401
AB184849_S._coeruleorubidus_NB
AF452714_S._speibonae
AB184422_S._pulcher_NBRC_13462
AB184712_S._heliomycini_NBRC_1
PY3-21
AY999855_S._lateritius_IFO_127
AY289116_S._aureofaciens_IMET
AB184884_S._variabilis_NBRC_12
AB184186_S._vinaceus_NBRC_1284
AJ781321_S._griseoincarnatus_L
AB184704_S._labedae_NBRC_15864
AB184516_S._pseudogriseolus_su
AB184139_S._griseorubens_NBRC_
AJ781322_S._griseoflavus_LMG_1
AB184786_S._flaveolus_NBRC_371
AB184628_S._paradoxus_NBRC_148
AB184584_S._thermocoerulescens
AY999782_S._almquistii_NRRL_B-
AY999791_S._althioticus_NRRL_B
AB184221_S._matensis_NBRC_1288
AY999773_S._aurantiogriseus_NR
DQ026640_S._cinnabarinus_NRRL_
Micromonospora_aurantiaca_DSM_

TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGC

AB184581_S._thermoluteus_NBRC_
AB184317_S._viridodiataticus_
AJ494865_S._albogriseolus_NRRL
AB184877_S._iakyrus_NBRC_13401
AB184849_S._coeruleorubidus_NB
AF452714_S._speibonae
AB184422_S._pulcher_NBRC_13462
AB184712_S._heliomycini_NBRC_1
PY3-21
AY999855_S._lateritius_IFO_127
AY289116_S._aureofaciens_IMET
AB184884_S._variabilis_NBRC_12
AB184186_S._vinaceus_NBRC_1284
AJ781321_S._griseoincarnatus_L
AB184704_S._labedae_NBRC_15864
AB184516_S._pseudogriseolus_su
AB184139_S._griseorubens_NBRC_
AJ781322_S._griseoflavus_LMG_1
AB184786_S._flaveolus_NBRC_371
AB184628_S._paradoxus_NBRC_148
AB184584_S._thermocoerulescens
AY999782_S._almquistii_NRRL_B-
AY999791_S._althioticus_NRRL_B
AB184221_S._matensis_NBRC_1288
AY999773_S._aurantiogriseus_NR
DQ026640_S._cinnabarinus_NRRL_
Micromonospora_aurantiaca_DSM_

GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
GAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG

AB184581_S._thermoluteus_NBRC_
AB184317_S._viridodiataticus_
AJ494865_S._albogriseolus_NRRL
AB184877_S._iakyrus_NBRC_13401
AB184849_S._coeruleorubidus_NB
AF452714_S._speibonae
AB184422_S._pulcher_NBRC_13462

CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAA

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micromonospora_aurantiaca_DSM_

AGGTGCCGTACCG-----



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้