ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

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

ฉัตรฑริกา มูลมาก
ณัฐนันท์ ทรงศรี
ภัทรานิษฐ์ แฝงพงศ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร

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

ฉัตรฑริกา มูลมาก
ณัฐนันท์ ทรงศรี
ภัทรานิษฐ์ แฝงพงศ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

Neuroprotective activity of crude extract of Microbispora isolate from Thai medicinalplant

Chattharika Moonmark
Natthanan Songsri
Pattranit Faengphong

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร Neuroprotective activity of crude extract of Microbispora isolate from Thai medicinalplant
นักศึกษา	นางสาวฉัตรฑริกา มูลมาก รหัสนักศึกษา 55051071 นางสาวณัฐนันท์ ทรงศรี รหัสนักศึกษา 55051089 นางสาวภัทรานิษฐ์ แฝงพงศ์ รหัสนักศึกษา 55051147
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศต์ ประธานกรรมการ	
ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการ	

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฉัตรฑริกา	มูลมาก	รหัสนักศึกษา 55051071
	นางสาวณัฐนันท์	ทรงศรี	รหัสนักศึกษา 55051089
	นางสาวภัทรานิษฐ์	แฝงพงศ์	รหัสนักศึกษา 55051147
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติ ท่าไว		

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 18 ไอโซเลต ถูกแยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย เชื้อเหล่านี้ถูกระบุชนิดระดับสกุลเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ข้อมูลของยีน 16S rRNA ผลที่ได้พบว่าทุกเชื้อเป็นสมาชิกในสกุลไมโครไบสปอรา น้ำหมักเชื้อของสายพันธุ์ที่คัดเลือก ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3 และ KM1-2 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต สารสกัดหยาบที่ได้ถูกทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่สามารถปกป้องเซลล์ประสาท P19 จากสภาวะเครียด ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อทั้งสี่ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้ คิดเป็นร้อยละ 47.58 35.09 39.31 และ 33.99 ตามลำดับ

คำสำคัญ : แอคติโนมัยสีท เซลล์ประสาท P19 ไมโครไบสปอรา ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท ออกซิเดทีฟสเตรท

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

Abstract

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

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

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงงานพิเศษเรื่อง ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย คณะผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำคำปรึกษามาโดยตลอด และให้ความอนุเคราะห์เชื้อไมโครไบสปอราทั้ง 18 ไอโซเลตสำหรับใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สริน ทัดทอง อาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจฤทธิ์การกระตุ้นประสาท และขอขอบพระคุณคณะกรรมการทั้ง 2 ท่าน ได้แก่ ดร.คนึงการต์ กลั่นบุศต์ และ ดร.ดวงกลม เรือนงาม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ชี้จุดบกพร่องแก้ไขข้อผิดพลาดที่คณะผู้จัดทำมองข้ามไปหลายจุด ซึ่งทำให้โครงงานพิเศษเล่มนี้มีคุณภาพและความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด จนสามารถทำให้โครงงานพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง กราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สิ่งสำคัญที่ขาดไม่ได้เลยนั้นก็คือคุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นบุพการีที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

นางสาวฉัตรฑริกา มูลมาก รหัสนักศึกษา 55051071

นางสาวณัฐนันท์ ทรงศรี รหัสนักศึกษา 55051089

นางสาวภัทรานิษฐ์ แฝงพงศ์ รหัสนักศึกษา 55051147

สารบัญ

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

สารบัญรูป

สารบัญรูป (ต่อ)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย

จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระบวนการเมทาบอลิซึมที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ได้หลายชนิด โดยที่ผ่านมานั้นแอคติโนมัยสีทเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญในช่วงค.ศ.1960 ถึง 1970 ซึ่งการค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทมีมากถึงร้อยละ 75-80 ของการค้นพบสารปฏิชีวนะทั้งหมด (Coyne, 1990) จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีท พบว่าเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและบางชนิดสามารถพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้

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

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

จากความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้กล่าวมานั้น งานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นในการหาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ซึ่งเป็นสกุลหนึ่งที่ผลิตสารทุติยภูมิได้และมีการศึกษาไม่มากนัก เนื่องจากเชื้อในสกุลนี้เป็นเชื้อที่หายากเพราะการกระจายตัวของเชื้อในแหล่ง

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

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องประสาทที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* sp.

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาอนุกรมวิธาน ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจีโนไทป์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* spp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบฤทธิ์ปกป้องประสาทที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อ *Microbispora* spp.

1.4.2 สามารถเรียนรู้และทราบถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อไมโครไบสปอราได้อย่างเหมาะสม เพื่อนำไปปรับใช้ในการเลี้ยงเชื้ออื่นๆต่อไปในอนาคต

1.4.3 โครงการพิเศษนี้จะนำไปใช้ในการพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ และเป็นประโยชน์ต่อวิทยาศาสตร์สาธารณสุขสาขาอื่นได้

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.5.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่นำมาศึกษา

1.5.2 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Microbispora* spp. ที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรไทย

1.5.3 สกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Microbispora* spp.

1.5.4 นำสารสกัดหยาบจาก เชื้อ *Microbispora* spp. ทดสอบฤทธิ์ปกป้องประสาท

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทอยู่ในชั้นแอคติโนแบคทีเรีย (Class Actimobacteria) อันดับ Actinomycetales (Miyadoh, 1997) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในชั้นย่อยแอคติโนแบคเทอริเด (Subclass Actinobacteridae) ในดีเอ็นเอของแอคติโนมัยสีทมีปริมาณสาร G+C ใน GC content อยู่ 57-75 เปอร์เซ็นต์ (Lo et al., 2002) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกับเชื้อราและแบคทีเรียคือ มีการเจริญเป็นเส้นใย ในการสร้างเส้นใยนั้นจะแบ่งเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เพื่อดูดซึมสารอาหารจากสิ่งแวดล้อมเพื่อการเจริญและเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยเส้นใยอากาศนั้นพัฒนาเป็นสปอร์ สปอร์ของแอคติโนมัยสีทเป็นสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ มีคุณสมบัติทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานานแต่สปอร์ของเชื้อจะไม่สามารถทนร้อนได้มากนัก แต่ก็มีเชื้อแอคติโนมัยสีทบางชนิดที่ไม่มีการสร้างเส้นใยอาหาร ในส่วนของความคล้ายคลึงแบคทีเรียนั้นพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทผนังเซลล์ประกอบด้วยมิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มไมโครแบคทีเรียม (Mycobacterium) อีกทั้งยังไม่มีเนื้อหุ้มไมโตคอนเดรีย และไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

แอคติโนมัยสีทสามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ โคลน ในพืชหรือสามารถกล่าวได้ว่าสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยแหล่งที่พบมากที่สุดได้แก่บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น บริเวณน้ำพุ ป่าชายเลน หรือใต้ทะเล และยังพบมากในดินรอบรากพืช (rhizospere) โดยมีมากกว่า 100 สกุล ของเชื้อแอคติโนมัยสีทพบมากในดินที่มีค่าความกรด-ด่างระหว่าง 6.5-8.0 หลังจากมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอคแอคติโนมัยสีทครั้งแรกเมื่อ 50 กว่าปีก่อน (Schatz et at. 1944) ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทนั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมาย จากข้อมูลพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยสีทร้อยละ 45 เชื้อราร้อยละ 38 และแบคทีเรียร้อยละ 17 (Berdy, 2005)

ตารางที่ 2.1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ

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

(ที่มา : Bérdy ,2005)

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดคือเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) (ตารางที่2.1) ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะ ได้ร้อยละ 70 (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) ผลิตได้ร้อยละ 5 (740 ชนิด) แอคติโนมัยซีทพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไปโดยเฉพาะในดินบนบก สิ่งมีชีวิตชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายซากพืชและสัตว์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ

ตารางที่ 2.2 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

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

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

(ที่มา : Bérdy, 2005)

2.1.1 ประโยชน์ของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีท

ประโยชน์ของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทนี้มีประโยชน์ เช่น ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในดินทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ แอคติโนมัยซีทมีบทบาทต่อระบบนิเวศน์ของดินโดยช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุโดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น เซลลูโลส เช่นเดียวกันกับเชื้อราแต่จะเจริญหลังจากที่เชื้อรา และแบคทีเรียได้เจริญเต็มที่ และลดจำนวนลงแล้ว ตั้งแต่ช่วงปลายทศวรรษ 1970 เป็นต้นมาพบว่าแอคติโนมัยซีทตรึงก๊าซไนโตรเจนได้โดยการอยู่ร่วมกับรากพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้เขตอบอุ่นประเภทผลไม้เนื้ออ่อน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอคติโนมัยซีทบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ร่วมกับรากข้าวในนาน้ำขังไม่เฉพาะเจาะจงเหมือนกับแบคทีเรียไรโซเบียมกับรากพืชตระกูลถั่วเท่านั้น นอกจากทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์แล้วยังมีความสำคัญทางการแพทย์ และทางอุตสาหกรรม โดยสามารถนำมาผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Goodfellow และคณะ, 1988)

2.2 ประวัติ และลักษณะของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

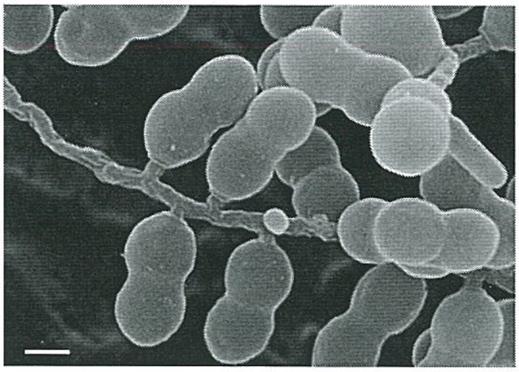
เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ได้ถูกจัดอยู่ในแฟมิลี่สเตรปโตสปอแรงเจียซีอี (*Streptosporangiaceae*) ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อสกุลแอคติโนคาโปสปอรา (*Actinocapospora*) คาวีสปอแรงเจียม (Clavisporangium, เฮอร์บิโดสปอรา (*Herbidospora*) ไมโครเตตะสปอรา (*Microtetraspora*) โนโนโมราอี (*Nonomorae*) พลาโนไบสปอรา (*Planobispora*) สเฟียโรสปอแรงเจียม (*Sphaerosporangium*) สเตรปโตสปอแรงเจียม (*Streptosporangium*) เทอร์โมโพลีสปอรา (*Thermopolyspora*) อะโครคาโปสปอรา (*Acrocarpospora*) และไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ซึ่งเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) นี้จะมีลักษณะที่ต่างออกไปจากเชื้อสกุลอื่นๆในแฟมมิลี่นี้ คือ สามารถสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ สปอร์มีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร มีสีของเส้นใยอาหารเป็นสีแดงอมชมพูจนถึงชมพูอมน้ำตาล สีของเส้นใยอากาศคือ สีชมพูและสามารถสร้างรงควัตถุบนอาหารสีเหลืองอ่อน

2.2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

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

2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

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



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

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

ลักษณะการเจริญของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ส่วนใหญ่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 17 ถึง 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นในกลุ่มของไมโครไบสปอรา โรซีเอ (*Microbispora rosea*) ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) บางสายพันธุ์สามารถย่อยเคซีน (casein) และเอสคูลิน (aesculin) ได้แต่ไม่สามารถสลายอะดินีน (adenine) อิลาสติน (elastin) กัวนีน (guanine) ไฮโปแซนทิน (hypoxanthine) เคราติน (keratin) เทสโทสเทอโรน (testosterone) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) แซนทิน (xanthine) ไซแลน (xylan) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ได้ ส่วนการใช้สารประกอบคาร์บอนพบว่าส่วนใหญ่เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) สามารถใช้อะมิกดาลิน (amygdalin) แอล-อะราบีโนส (L-arabinose) อาร์บูติล (arbutin) ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) ดี-ฟรุกโตส (D-fructose) ดี-กาแลกโตส (D-galactose) ดี-กลูโคส (D-glucose) มอลโตส (maltose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-เมเลซีโทส (D-melezitose) ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) เมทิล แอลฟา ดี-ไกลโคไซด์ (Methyl a-d-glucoside) ดี-ไรโบส (D-ribose) ซาลิซิน (salicin) ดี-ซอบิทอล (D-sorbital) แอล-ซอบิทอล (L-sorbital) แป้ง (starch) ซูโคส (sucrose) ดี-ทีฮาโลส (D-trehalose) และ ดี-ไซโลส (D-xylose) แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ เช่น อะโดนิทอล (adonitol) ดี-อะราบิทอล (D-arabitol) ดัลซิทอล (dulcitol) ไอโซ-อิริทริทอล (Iso-erythritol) อินูลิน (Inulin) ดี-ราฟฟิโนส (Draffinose) แอล-แรมโนส (L-rhamnose) หรือไซลิทอล (xylitol) สำหรับกรดอินทรีย์ที่เชื้อส่วนใหญ่ในสกุลนี้สามารถใช้ได้คือ กรดฟูรามิก (furamic acid) กรดมูซิก (mucic acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) หรือกรดตราตาริก (L-tartaric acid) ในการเจริญเติบโตได้ (Nakajima, 1999)

2.2.1.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ของอนุกรมวิธานแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ทำหน้าที่ที่สำคัญคือ ทำให้แบคทีเรียสามารถคงรูปอยู่ได้ และช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตกเนื่องจากความแตกต่างของแรงดันออสโมซิสระหว่าภายนอกและภายในเซลล์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์พบว่าเซลล์จุลินทรีย์จะประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น ลิโพโพลิแซกคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์จัดเป็นลักษณะของแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มีองค์ประกอบของแบคทีเรียแกรมบวกนั้นสามารถดูชนิดของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์โดยวิเคราะห์ที่รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมิลิก (Diaminopimelic acid isomer) ที่เป็นองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ในผนังเซลล์ ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเอ็น-อะซิทิ่ลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิก (N-acetylmuceamic acid) เกาะเรียงกันเป็นสายยาวสลับกันไป และบริเวณกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิกจะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน กรดอะมิโนนี้จะไปเชื่อมกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซิทิลมิวรามิกอีกโมเลกุลหนึ่งโดยอาศัยพันธะเปปไทด์เป็นตัวเชื่อม จึงเรียกว่า อินเตอร์เปปไทด์บริดจ์ (Interpeptide bridge)

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

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

ไกลแคนแบบ A_1gramma (Schleifer และ Kandler, 1972) ลักษณะของผนังเซลล์เป็นแบบ Type 3 (Lechevalier และ Lechevalier, 1970) หมู่ *N*-acetyl ของกรดกลูตามิกในเปปติโดไกลแคนเป็นหมู่อะซิทิล (Acetyl type)

ก. การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall)

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

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

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

ข. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell hydrolysate)

การหาลักษณะเคโมไทป์ของผนังเซลล์ (cell wall chemotypes) โดยน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ จะมีรูปแบบของน้ำตาลในเชื้อแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) จะพบน้ำตาลมาดูโรสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ในเซลล์

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

ตารางที่ 2.3 แสดงรูปแบบของน้ำตาลที่พบในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

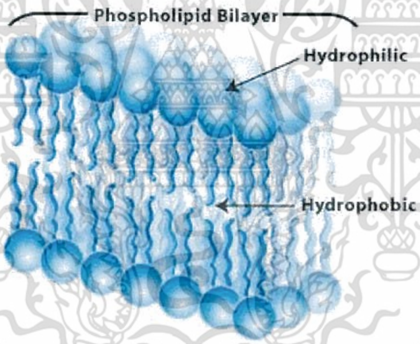
Pattern	Sugar				
	Arabinose	Fucose	Galactose	Madurose*	Xylose
A	+		+		
B				+	
C			No diagnostic sugars		
D	+				
E					+
		+			

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

(ที่มา : จิตติ, 2547)

ค. ฟอสโฟลิพิด (Phosphoglyceride)

ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) หรือฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride) หรือกลีเซอรอลฟอสฟาไทด์ (Glycerol Phosphatide) หรือกลีเซอโรฟอสโฟลิพิด (Glycerophospholipid) เป็นเอสเตอร์ระหว่ากรดฟอสโฟริก (H_3PO_4) กับหมู่ไฮดรอกซิล หนึ่งหมู่ของกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ กรดฟอสฟาติดิก (phosphatidic acid) เป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ที่ง่ายที่สุด และพบในปริมาณน้อยมากในเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล และฟอสโฟลิพิด ฟอสโฟกลีเซอไรด์ ทุกตัวเป็นโพลาร์ลิพิด หรือแอมฟิพาธิก (amphipathic) ฟอสฟาติดิลเอธานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) พบมากที่สุดในเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช และสัตว์ชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบฟอสฟาติดิลซีรีน (phosphatidylserine) อีกด้วย ส่วนคาร์ดิโอลิพิน (cardiolipin) เป็นส่วนประกอบของเยื่อไมโทคอนเดรีย และเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

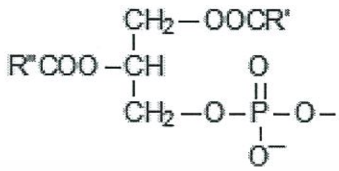
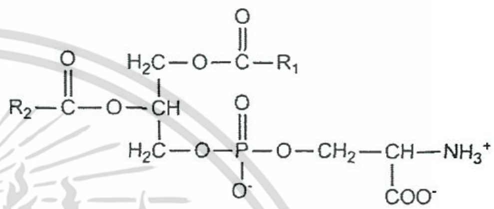
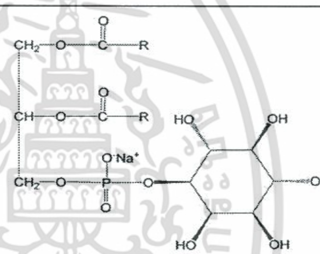
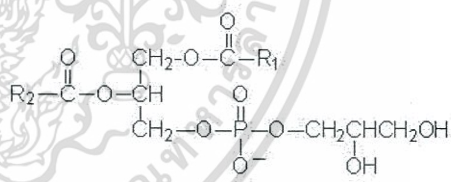
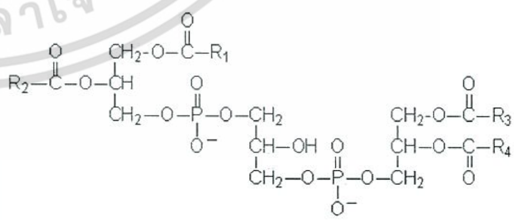


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด (phospholipids structure)

ฟอสโฟลิปิด เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และมีความสัมพันธ์ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ ลักษณะพิเศษของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุล

พื้นฐานของฟอสโฟลิปิดดังแสดงในตารางที่ 2,4 นอกจากนี้ยังมีไกลโคลิปิด (glycolipids) (Shaw, 1970), ไลโปอะมิโน (Lipoamino acids) (Tahara และคณะ, 1976a, b) และสปิงโกลิปิด (Sphingolipids) (Miyagawa และคณะ, 1978, 1979; Yamamodo และคณะ, 1978; Yomo และคณะ, 1982) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ชนิดฟอสโฟลิปิดโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

ตารางที่ 2.4 ภาพฟอสโฟลิปิดที่พบในแบคทีเรีย

ชื่อ	ชื่อย่อ	โครงสร้าง
Phosphatidylcholine	PC	
Phosphatidylserine	PS	
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylglycerol	PG	
Diphosphatidylglycerol	DPG	

ตารางที่ 2.5 แสดงชนิดฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยซีท

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

หมายเหตุ PIM คือ ฟอสฟาทิดิลอิโนซิทอลแมโนไซด์ PI คือ ฟอสฟาทิดิลอิโนซิทอล PC คือ ฟอสฟาทิดิลโคลีน PG คือ ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล PE คือ ฟอสฟาทิดิลเอทาโนลามีน PME คือ ฟอสฟาทิดิลเมทิลเอทาโนลามีน GluNU คือ สารประกอบฟอสเฟสของกลูโคซามีน APG คือ อะดินิลฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล DPG คือ ไดฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล V คือ ไม่แน่นอน + คือ ตรวจพบ – คือตรวจไม่พบ

(ที่มา : จิตติ, 2547)

ง. ลักษณะของกรดไขมัน (Cellular fatty acids)

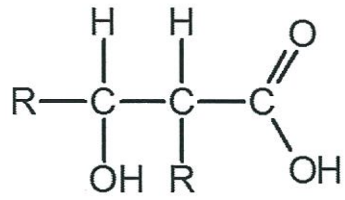
กรดไขมันเป็นสารประกอบสำคัญในเซลล์ไขมัน ซึ่งพบในกลุ่มของอาเคียแบคทีเรีย (archaebacteria) ในบางชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างก๊าซมีเทน (Methanogenic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญได้ที่เข้มข้นของเกลือสูง (Halophilic bacteria) กรดไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ที่ตำแหน่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งประกอบด้วยลิพิดที่มีขั้ว (polar lipid) และไกลโคลิพิด (glycolipids) แบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปจะมีกรดไขมันหลายชนิดในเซลล์ทีสามารถควบคุมวิถีการสังเคราะห์ผลผลิตได้สูง (Lennarz, 1966) และอนุกรมวิธานของกรดไขมันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกประเภทของแบคทีเรียได้

ตารางที่ 2.6 รูปแบบของกรดไขมันในเซลล์

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

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

จ. กรดไมโคลิค (Mycolic acids)



Mycolic Acid

รูปที่2.3 โครงสร้างของกรดไมโคลิค

กรดไมโคลิค เป็นกรดไขมันที่มีโครงสร้างเป็นหมู่แอลคิล (alkyl) สายยาว ดังแสดงในรูปที่2.3 จำนวนคาร์บอนทั้งหมดของกรดไมโคลิคมีประมาณ 24-90 ตัว กรดไมโคลิกเป็นกรดไขมันที่พบในแบคทีเรยไมโครแบคทีเรียม (*Mycobacterium*) ในคาร์เดีย (Nocardia) โรโตค๊อกคัส (Rhodococcus) โคลินีแบคเทอเรียม (Corynebacterium) ซึ่งแบคทีเรียมีกรดไมโคลิกจะมีผนังเซลล์แบบชนิดที่ 4 มีโส-ไดอะมิโนพิเมลิก แอซิต อะราบิโนส และกาแลคโทส (*meso*-diaminopimelic acid และ arabinose และ galactose) (Lecheavalier, 1970) นอกจากนี้กรดไมโคลิคยังมีคุณสมบัติในการติดสี คือติดสีทนกรด (acid fastness) สูงหรือเรียกว่าแบคทีเรียติดสีทนกรด (Alshamaony และคณะ, 1977; Wada และคณะ, 1981) และในการวิเคราะห์กรดไมโคลิกสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกระดับตระกูล (genus) ของแบคทีเรียได้

กรดไมโคลิคพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียในชั้นผนังเซลล์ยังประกอบด้วยคอร์ตแฟกเตอร์ (cord factor) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เชื้อไมโครแบคทีเรีย (*Mycobacteria*) สามารถรวมกลุ่มกัน และเห็นลักษณะคล้ายฟั่นเชือกเมื่อตรวจทางจุลภาคซึ่งคอร์ดแฟคเตอร์ (cord factor) มีบทบาทในการก่อโรคโดยสามารถยับยั้งการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่ตำแหน่งติดเชื้อ และกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกรานูโลมา (granuloma) ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังบนชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (พิมพา, 2550) และใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้เชื้อไมโครแบคทีเรีย (*Mycobacteria*) ในส่วนของการทำงานของกรดไมโคลิคขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลในด้านโครงสร้างชีวสังเคราะห์ และสรีระวิทยาโดยเป็นพื้นฐานของการวิเคราะห์ถึงอนุกรมวิธานของกรดไมโคลิค

ฉ. ไอโซพรีนอย ควิโนน (Isoprenoid quinones)

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

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

Yamada และคณะ (1977) ได้ทำการศึกษาตำแหน่งการแทนที่หมู่ไฮโดรเจนในสายไอโซพรีนิลของมีนาควิโนน ในบางสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับสายพันธุ์ที่หลายของแบคทีเรีย จึงใช้เป็นข้อมูลสะสมในการศึกษาอนุกรมวิธานต่อไป

ในการวิเคราะห์หาไอโซพรีนอยควิโนนส่วนใหญ่เป็น มีนาควิโนน และยูบิควิโนน ใช้เครื่องแมสสเปกโทรเมทรี่ (Mass spectrometry) เป็นเครื่องวิเคราะห์หาควิโนน และยังมีการใช้เครื่อง HPLC และโครมาโทรกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ซึ่งชนิดหลังนี้ช่วยวิเคราะห์กาควิโนนได้อย่างรวดเร็ว

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

ช. ผนังเซลล์ชนิดเอซิล (Cell-wall acyl type)

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

ซ. องค์ประกอบกรดอะมิโนในเปปติโดไกลแคน

โครงสร้างเปปติโดไกลแคนไม่ได้พบเพียงสารประกอบของกรดอะมิโนสามารถวิเคราะห์โดยโครมาโทรกราฟีแบบผิวบางหรือ HPLC การเตรียมเปปติโดไกลแคนจะประกอบด้วยเซลล์ที่แตก และตัวอย่างที่บริสุทธิ์ ขั้นตอนแรกของการเตรียมผนังเซลล์คือการทำให้เซลล์แตก และขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์คือ ต้องนำโปรตีน กรดนิวคลิอิก คาร์โบไฮเดรต และไขมันแยกออกจากตัวอย่าง

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีกล่าวโดยสรุปได้ดังนี้

1. มีรูปแบบของผนังเซลล์แบบที่ 3 (well chemotype III) คือผนังเซลล์มีกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) เป็นองค์ประกอบหลัก, กรดกลูตามิก (glutamic acid), กลูโคซามีน (glucosamine), กรดมีโซ-ไดอะมิโนพิเมลิก (meso-diaminopimelic acid) และกรดมิวรามิก (muramic acid)

2. ลักษณะของเปปติโดไกลแคนแบบ $A1_{\delta}$ (peptidoglycan type $A1_{\delta}$)

3. มีน้ำตาลมาดูโรส (madurose) เป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ (characteristic $A1_{\delta}$)

4. มีรูปแบบของกรดไขมัน(fatty acid profile) แบบ 3c คือ ในเซลล์พบทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid), กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และกรดไขมันที่แตกกิ่งก้านทั้งแบบไอโซแอนไทไอโซ และกิ่งเมทิล (iso-anteiso- และ methyl-branched fatty acid)

5. มีเมนาควิโนนหลัก (predominant menaquinone) ชนิด MK-9

6. รูปแบบของฟอสโฟลิปิด แบบที่ 4 (phospholipids containing glucosamine) และอาจพบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติดิลเมทิลเอทาโนลามิน (phosphatidylmethylethanolamine)

2.2.1.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

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

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

(เนื่องจากในจีโนมของแบคทีเรียมียีนนี้เพียงชุดเดียว) ขั้นตอนที่สำคัญคือ การใส่เงื่อนไขต่างๆก่อนการออกแบบไพรเมอร์ ยีนนี้มีความยาวประมาณ1500 เบส และเพิ่มความจำเพาะของชิ้นส่วนที่จะได้โดยการใช้ไพรเมอร์หลายๆชุด(คู่) และเลือกชุดที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนั้นๆ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอ (ผลผลิตของพีซีอาร์) จะมีความชัดเจนควรมีเพียงแถบเดียว (การมีแถบดีเอ็นเออื่นๆ ขึ้นมาแม้ว่าจะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า และมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็จะมีผลเสียมากในขั้นตอนการหาลำดับเบสของยีน เนื่องจากทำให้ยากต่อการแยกยีนให้บริสุทธิ์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากการทดสอบแล้ว จึงเริ่มการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ Genomic DNA ของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบต่อไป อาจตรวจสอบไพรเมอร์ไปพร้อมๆกับการโคลนยีนได้ ซึ่งมีหลายๆวิธีในการกำหนดเงื่อนไขของพีซีอาร์ (PCR Protocol)

การหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene ที่เป็นผลจากการทำพีซีอาร์ การหาลำดับเบสสามารถทำได้โดยวิธี Automated DNA Sequence คือ การหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ มีหลักการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในธรรมชาติอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสคู่สม (complementary base) กับดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี cycle sequencing ซึ่งจะต้องใช้ร่วมกับเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) สำหรับแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอบนวุ้นที่เรียกว่า Slab gel ค่าที่อ่านได้จะมีความละเอียดสามารถแยกขนาดชองดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้พัฒนาเป็นระบบ capillary electrophoresis ซึ่งจะลดขั้นตอนการเตรียมแผ่นวุ้นทำให้ใช้งานได้สะดวก และแม่นยำขึ้นสามารถรองรับงานวิจัยด้านจีโนมของสิ่งมีชีวิตและงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆได้มาก

วิธีการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมและได้รับการยอมรับสำหรับการใช้อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ไม่ทราบชนิดเทียบกับ type strain เช่นกรณีที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ร้อยละการจับกันของดีเอ็นเอเท่ากับร้อยละ 70 ขึ้นไปแสดงว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดเป็นเชื้อเดียวกัน โดยทั่วไปวิธีการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันในดีเอ็นเอจะใช้สารโฟโตไบโอติน (Photobiotin) เป็นตัวติดฉลากดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงจึงเรียกวิธีการนี้ว่า photobiotin lebeling DNA-DNA hybridization หรืออาจใช้อีกวิธีคือการนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบแยกให้เป็นสายเดี่ยวแล้วยึดบนไนโตรเซลลูโลสหรือแผ่นไนลอน สารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ต้องปราศจากเอนไซม์ S1 nuclease

2.2.2 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว

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

2.2.2.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. แหล่งคาร์บอน (carbon source)

โดยทั่วไปกลูโคสคือแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ขณะเดียวกันกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon metabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin, 1980) นอกจากกลูโคสแล้วยังมีมอลโตส (moltose) กลีเซอรอล (glycerol) และแป้งที่มีรายงานว่าใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ในการผลิต Hikizimycin ใช้มอลโตสร้อยละ 3 และกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Uchida และคณะ, 1971) ในการผลิต Neo-enacin ใช้ soluble starchร้อยละ 1.5 และกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Kenso และคณะ, 1979) ในการผลิต Aabamycin ใช้กลีเซอรอลร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ในการทดลองของดารารัตน์ รอดพยาธิ์ พบว่าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา (ดารารัตน์, 2525)

ข. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

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

Kanoksilapatham (1981) รายงานถึงการใช้ถั่วเหลืองบดละเอียดเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยในอาหารที่ใช้ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะจากสเตรปโตรมัยเซส (*Streptomyces*) จะให้ผลดีกว่าอาหารที่ใส่ลงในเปปโตน และ meat ectract เมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารทั้ง 2 ชนิด

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาโซเดียมไนเตรทมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต temenimycin (Shimi และคณะ, 1971)

ค. อนินทรีย์ฟอสเฟต (Inorganic phosphate)

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

ง. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts)

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

จ. โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals)

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

ฉ. สารตั้งต้น (precursors)

การผลิตเพนนิซิลิน-จี (penicillin G) ในปริมาณสูงโดยใช้เชื้อ *Penicillium chrysogennum* จะเกิดขึ้นโดยการเติมฟีนิวอะซิเตท (phenylacctate) เป็นสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ และการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในสิ่งมีชีวิตจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่ำ ด้วยเหตุนี้เมื่อเติม analogs เป็นสารตั้งต้น ในบางครั้งจะมีการใช้สารตั้งต้นนี้ทำให้เกิดผลผลิตชนิดใหม่

2.2.3 สารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุลไมโครสปอรา (*Microbispora*)

แอคติโนมัยซีทเป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่มใหญ่ที่ได้สำรวจ และพบว่าจีนัสสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) นี้เป็นกลุ่มจีนัสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ในจำนวนมาก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาหาสารปฏิชีวนะ (Okami และ Hotta, 1988) สารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อสกุลจีนัสสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) พบมากถึงร้อยละ 90 ของจำนวแอคติโนมัยซีททั้งหมด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อกลุ่มนี้สร้างได้มีหลายประเภท ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น แอมพิซิลิน (Ampicillin) และเพนนิซิลิน-เอ็น (Penicillin-N) สารต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ ไนสแตติน (Nystatin) พอลีออกซิน (Polyoxin) และแอนทราไซคลิน (Anthracycline) เป็นต้น

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

2.2.4 ประโยชน์ของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*)

เชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทได้ถือว่ามีความสำคัญซึ่งรวมถึงเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา(Microbispora) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ พบว่าเชื้อมักมีการสร้างสารทุติยภูมิขึ้นในช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) และช่วงต้นของระยะคงที่ (Stationary phase) ของการเจริญ ซึ่งสารที่สร้างนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ ถือว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด พบว่าเชื้อกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะได้นั้นมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันออกเป็นแฟมมิลี่ (Family) หรือลำดับ (Series) ได้ประโยชน์ของเชื้อไมโครไบสปอรานั้นยังมีการศึกษาน้อย อาจเนื่องจากเชื้อสกุลนี้มีการกระจายตัวไม่มากในแหล่งธรรมชาติเมื่อเทียบกับเชื้อสกุลอื่น แต่อย่างไรก็มีรายงานว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอราสามารถสร้างเอนไซม์ไพรูเวทฟอสเฟตไคเนส (pyruvate phosphate dikinase; PPDK) (Eisaki และคณะ, 1999) จากเชื้อไมโครไบสปอรา โรซีเอ (Microbispora rosea) subsp. aerate เอนไซม์ไพรูเวทฟอสเฟตไคเนสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน APM PPi และฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenolpyruvate) ไปเป็นสารพลังงานสูง และไพรูเวท (Pyruvate) เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งได้ศึกษาการโคลนยีน ggh-A จากเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) ยีนนี้ทำหน้าที่ถอด และแปลรหัสให้เอนไซม์ 1,4-บีตา-กลู

แคนกลูโคไฮโดรเลส (1,4-beta-glucan glucohydrolase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (Kimura และ Yoshihama, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆอีก เช่น การนำไปใช้เป็นสารช่วยในการสกัดสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydoxyalkanoate; PHA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นชีวพลาสติก (bioplastic) จากเชื้อไซโนโรโซเบียม บีริโรติ (Sinorhizobium meliloti) พบว่าเมื่อนำเซลล์ของไซโนโรโซเบียม บีริโรติ (Sinorhizobium meliloti) ที่สามารถสร้างสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมาต้มที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ที่ได้เติมหัวเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน พบว่าเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (Microbispora) มีส่วนช่วยในการสัดสารลีไฮกรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเวลล์ของ ไซโนโรโซเบียม บีริโรติ (Sinorhizobium meliloti) ได้ (Lakshman, 2006) ไมโครไบสปอรา โรซีเอ (Microbispora rosea) จัดเป็นผู้ผลิตเอนไซม์ดี-ไซโลส ไอโซเมอเรส (D-xyloseisomerase) ชั้นเยี่ยมเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) เป็นดี-ฟรุกโตส (D-tructose) ในระดับอุตสาหรรม (Crueger, 1982) นอกจากนี้เชื้อกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic microbisporse) ยังสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลาย และเปลี่ยนแปลงสารพวกเฮเทอโรพอลีแซคคาร์ไรด์ (heteropolysaccharide) เช่น เซลลูโลส (cellulose) ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้ดี จึงสามารถนำมาผลอตน้ำตาลจากของเหลือใช้ทางการเกษตรได้ (Waldron, 1986) สำหรับเชื้อไมโครไบสปอรา ไปสปอรา (Microbispora bispora) ได้มีรายงานว่าสามารถผลอตเอสไซม์เอนโดกลูแคนเนส (endoglucannase) เอนไซม์เอกโซกลูแคนเนส (exoglucannase) (Bartley และ Eveleigh, 1984) เอนไซม์อัลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส (α-L-arabinofuranosidase) เอนไซม์อนโดไซแลนเนส (endoxylanase; 1,4-β-D-xylanase) และเอนไซม์บีต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidaese) ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย (Ball และ MaCarthy, 1988)

2.3 การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

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

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Seong-Hwan Kim และคณะ.,2011

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

Mia Y. Summers และคณะ.,2006

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

Eftekharzadeh B และคณะ.,2010

ทำการศึกษาการยับยั้งภาวะออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ก่อให้เกิดแอมีลอยด์เบต้า ในเซลล์ประสาทจากผลการศึกษาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งแอมีลอยด์เบต้าในเซลล์ประสาท NT2 ที่พบได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย Actinomycetes ที่คัดแยกมาจากตัวอย่างดินโดยเลือกใช้การจัดจ้าแนกโดยใช้อนุกรมวิธานแบบโฟลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces antibioticus*

Xiachang Wang และคณะ.,2015

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

Won-Gon Kim และคณะ.,2001

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

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

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

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Yeast extract – malt extract broth (ISP2)

3.2.2 Oatmeal agar (ISP3)

3.2.3 Inorganic salts – starch agar (ISP4)

3.2.4 Glycerol – asparagine agar (ISP5)

3.2.5 Peptone – yeast extract iron agar (ISP6)

3.2.6 Tyrosine agar (ISP7)

3.2.7 Trace salts solution

3.2.8 Czapek’s sucrose agar (Difco)

3.2.9 Nutrient agar (Difco)

3.3 สารเคมี

3.3.1 กลูโคส (Glucose)

3.3.2 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

3.3.3 สารสกัดจากมอลล์ (Malt extract)

3.3.4 วุ้น (Agar)

3.3.5 โอ๊ตมิลล์ (Oatmeal)

3.3.6 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

3.3.7 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4·7H_2O$)

3.3.8 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.3.9 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

3.3.10 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

3.3.11 แอล-เอสพาราจีน (L – asparagine)

3.3.12 กลีเซอรอล (Glycerol)

3.3.13 เปปโตนไอรอนเอการ์ (Peptone iron agar)

3.3.14 แอลไทโรซีน (L-tyrosine)

3.3.15 ไอออนซัลเฟต ($FeSO_4·7H_2O$)

3.3.16 แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2·4H_2O$)

3.3.17 ซิงค์ซัลไฟด์ ($ZnSO_4·7H_2O$)

3.3.18 เอสพาราจีน (Asparagine)

3.3.19 ซูโคส (Sucrose)

3.3.20 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

3.3.21 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.3.22 สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract)

3.3.23 เปปโตน (Peptone)

3. 4 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp.

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

3.4.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทลงในอาหาร ยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (ISP2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ถึง 28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ ตรวจดูลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า ทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่น่าสนใจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

3.4.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่สนใจโดยการเลี้ยงลงบนอาหารกลูโคส แอสพาราจีน เอการ์ (glucose asparagines agar) (ภาคผนวก ก) อาหารนิวเทรียนท์ เอการ์ (nutrient agar) (ภาคผนวก ก) อาหารซา (Czapek’s agar) และอาหารต่างๆ ตาม International Streptomyces Project (ISP) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract – malt extract agar, ISP2) อาหารโอทมีท เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) (ภาคผนวก ก) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salts – starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์ (glycerol – asparagine agar, ISP5) (ภาคผนวก ก) อาหารเปปโตน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์ (peptone-yeast extract iron agar, ISP6) (ภาคผนวก ก) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) (ภาคผนวก ก) โดยทำการเขี่ยเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยดูการเจริญ สีและเส้นใยอาหาร และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system) (Kelly. 1964)

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype)

นำลำดับนิวคลีโอไทป์บนสายดีเอ็นเองของ 16S rRNA gene ที่ได้จาก รศ.ดร.จิตติ ท่าไว มาวิเคระห์สายวิวัฒนาการ (phylogrnrtic analysis) โดยทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล EXtaxon นำข้อมูลลำดับเบสมารวมกัน โดยใช้โปรแกรม Bioedit เพื่อตัดช่องว่าในสายดีเอ็นเอง และจำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylognetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.7 package (www0megasoftware.net/) (Yukphan et al., 2006)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

3.5.1 การหมักเชื้อเพื่อให้ผลิตสารและการสกัดสาร

นำเชื้อไมโครไบสปอรามาเลี้ยงในอาหารเหลวยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์ เอ็กแทกท์ (yeast extract – malt extract broth) ปริมาตร 150 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 14 วัน นำน้ำหมักเชื้อที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต (ethyl acetate) แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้ส่งไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องประสาทที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทพีสิบเก้า

เซลล์พีสิบเก้าจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α-MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NBCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

3.5.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์พีสิบเก้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทพีสิบเก้า

นำเซลล์พีสิบเก้าที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา 2×10^6 cells/mL เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α-MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ 0.5 μM all *trans*-retinoic acid (RA) ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการ เปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies

ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยไปเปต แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิวภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ 50 μg/mL poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออกปล่อยให้แห้งภายใต้รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 7×10^4 cells/mL (150 μL/well สำหรับ 96-well plate และ 1.5 mL/well สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเป็น α-MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน บรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นทำการเติม 10 μM cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทชนิดโคลิเนอร์จิก ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

3.5.2.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท รวมทั้งเพื่อหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทำการทดสอบดังนี้

นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วย 10% DMSO/H_2O เพื่อเตรียมความเข้มข้น 0.02 μg/mL สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.001 μg/mL และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO

นำสารละลายที่เตรียมขึ้น มาทดสอบกับเซลล์ประสาทพีสิบเก้า แล้วบ่มเซลล์ที่ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมและกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มควบคุมคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate) และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทกลุ่มตัวทำละลายควบคุมจะต้องมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 100 ± 5% จึงจะยอมรับว่าตัวทำละลายไม่มี ผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

นำเอาสารทดสอบที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่า 100% ที่ความเข้มข้น 0.001 μg/mL มาทดสอบ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดสภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation คือการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทในอาหารที่ไม่มีการเติมซีรัม การทดสอบทำได้โดยทำการเติมสารละลายสารทดสอบในความ

เข้มข้น 0.02 μg/mL ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัม ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.001 μg/mL และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย XTT reduction assay โดยกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (กลุ่มควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100% และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัมและมีตัวทำละลายเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate) และใช้ 1 nM quercetin เป็น positve control

การวิเคราะห์ข้อมูล

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสกุลไมโครไบสปอรา

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ ซึ่งการเก็บผลทดลองเลือกใช้อาหาร ISP2 เป็นมาตรฐานเปรียบการเจริญและสีโคโลนีของเชื้อเนื่องจากเป็นอาหารที่เชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญเติบโตได้ดีที่สุด, ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ (ภาคผนวก ค)

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

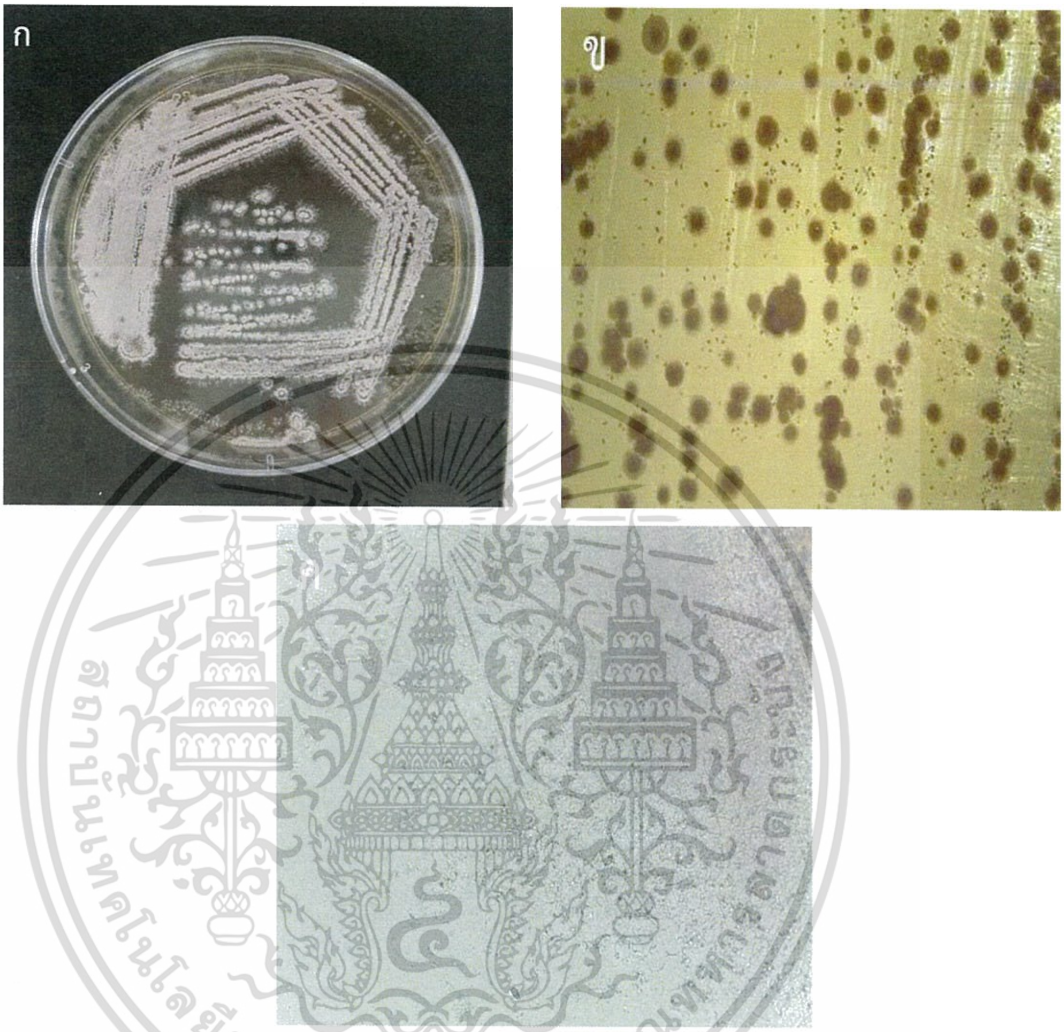
(1) เชื้อไอโซเลต AN2-5

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

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

<u>ลักษณะทางจีโนไทป์</u>

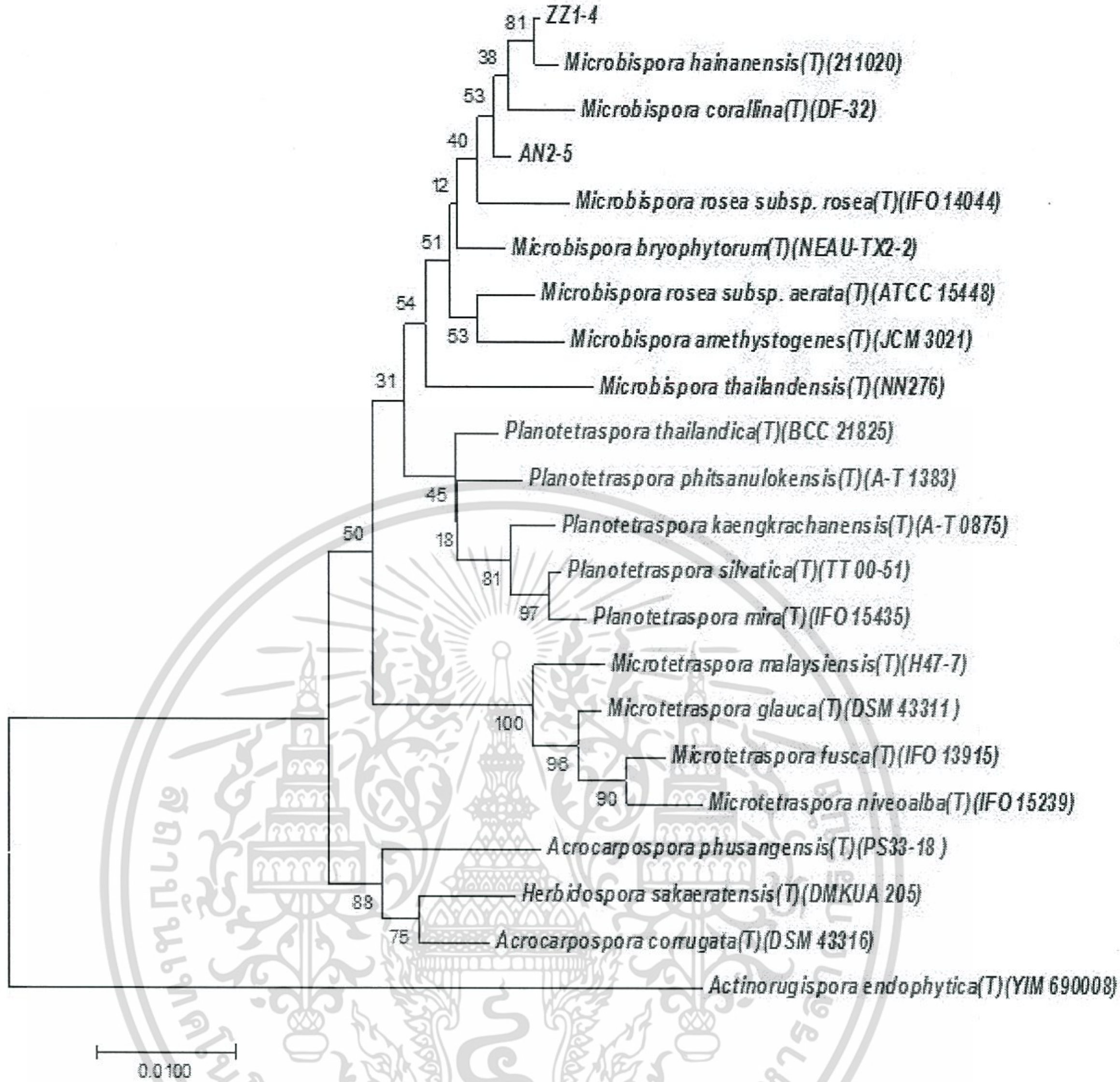
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต AN2-5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AN2-5

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



รูปที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-5 และ ZZ1-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

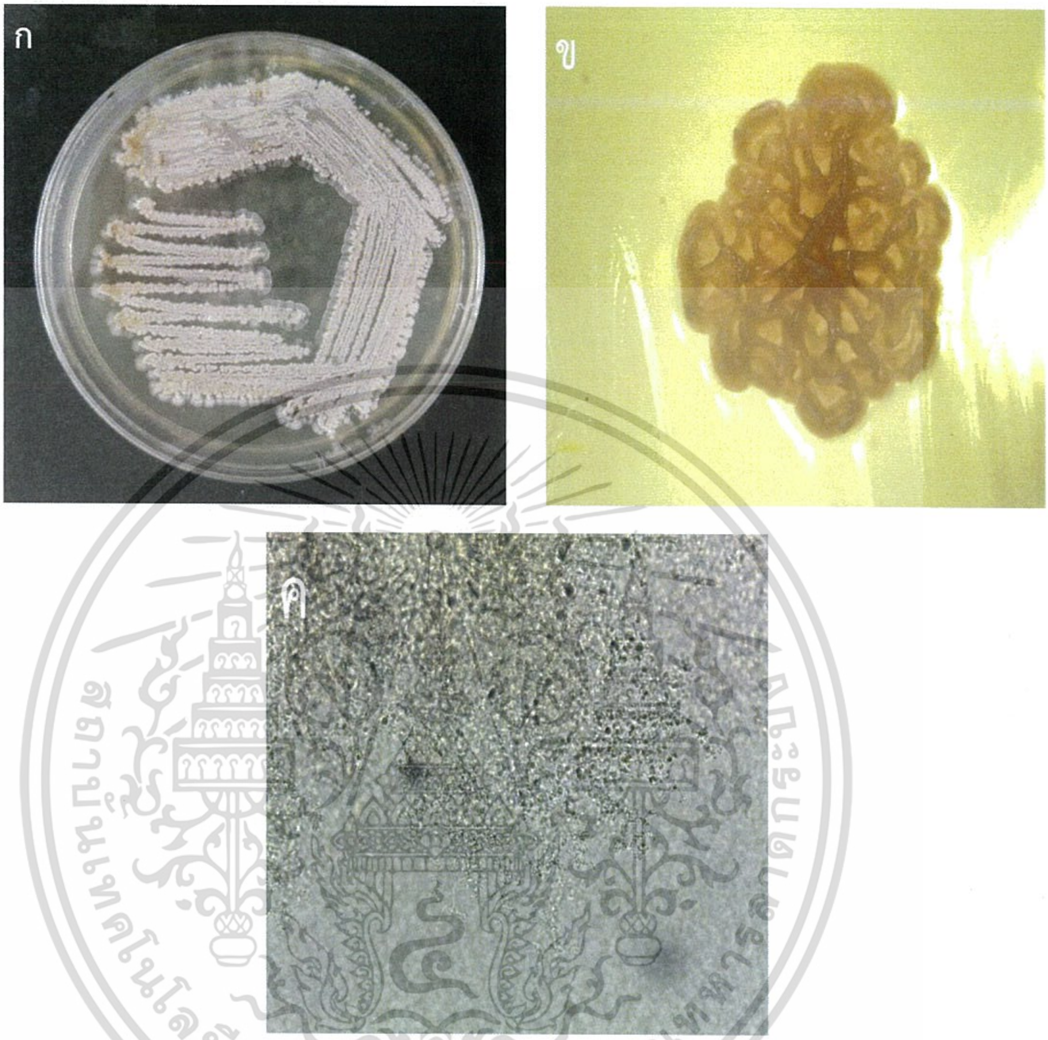
(2) เชื้อไอโซเลต BR3-3

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

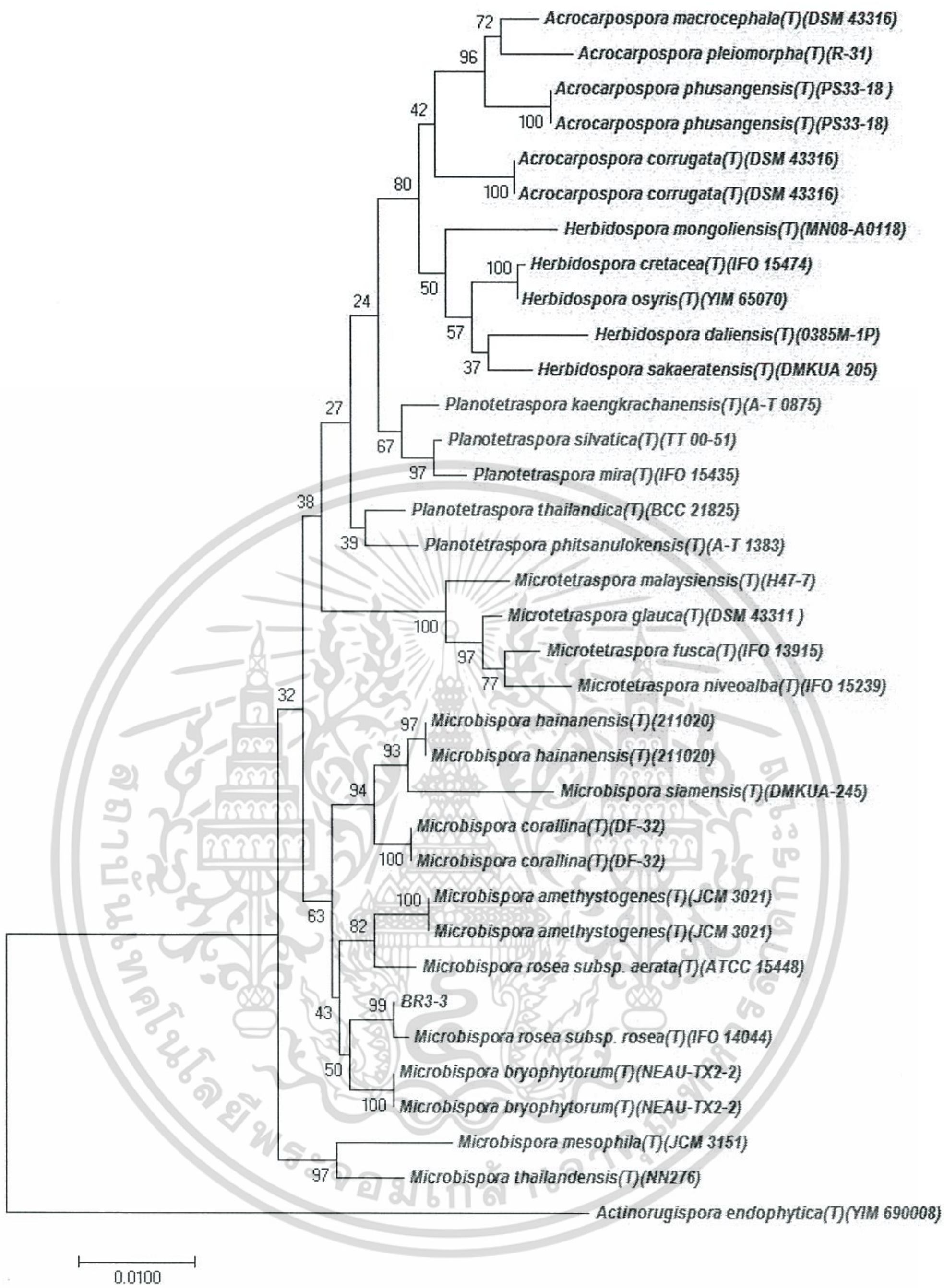
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต BR3-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic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



รูปที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BR3-3

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

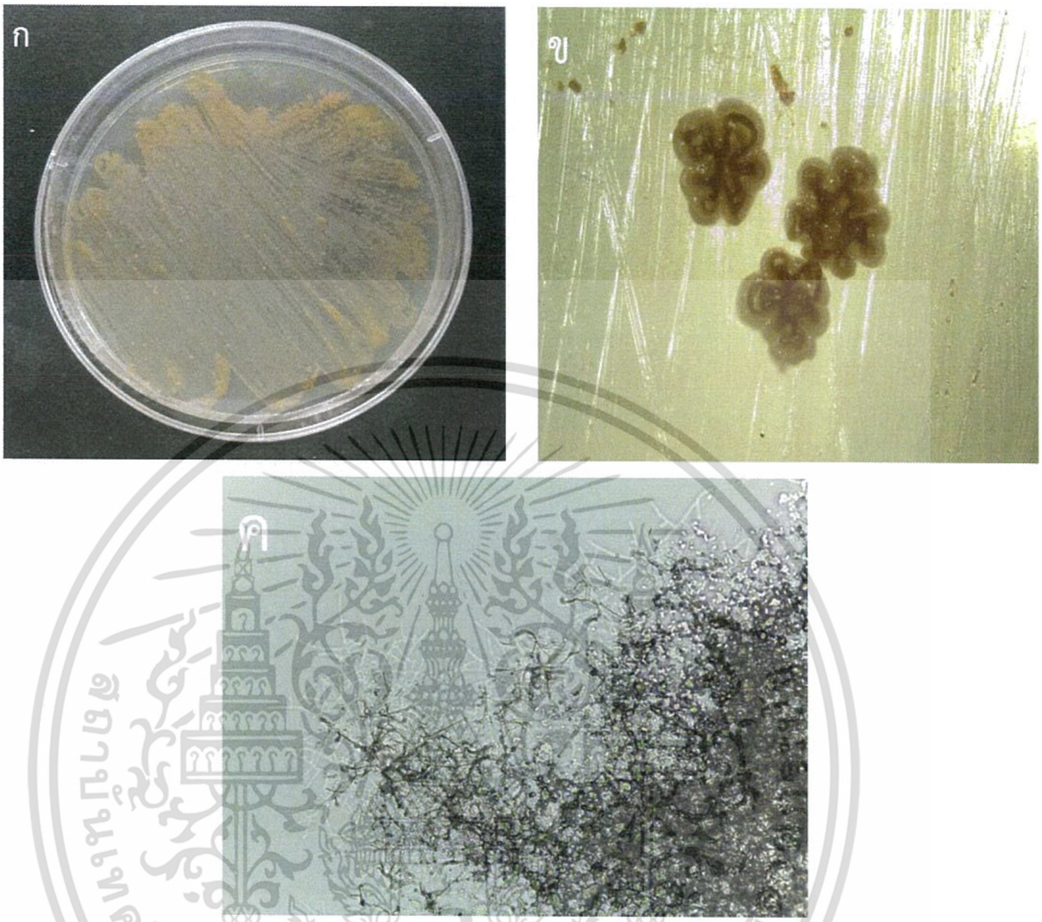
(3) เชื้อไอโซเลต CL1-1

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

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

<u>ลักษณะทางจีโนไทป์</u>

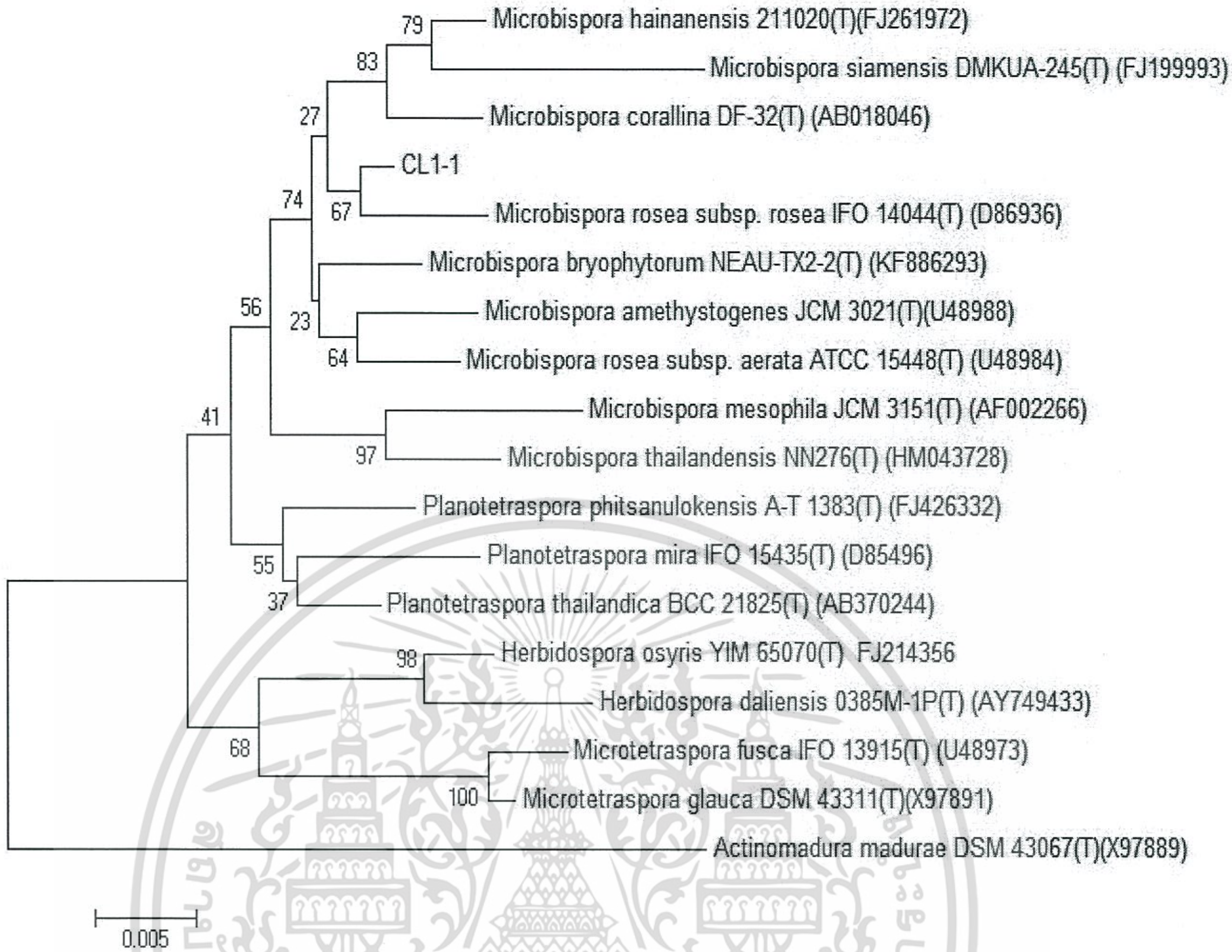
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต CL1-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL1-1

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

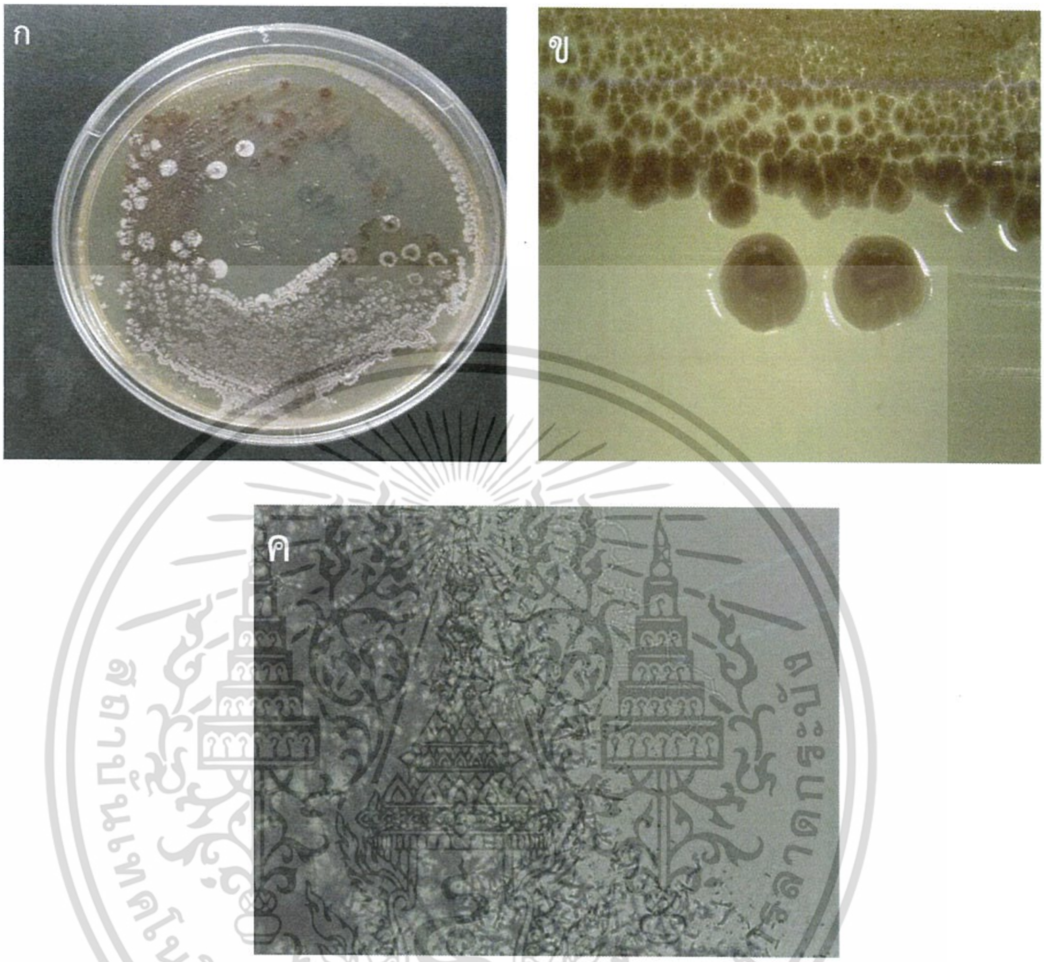
(4) เชื้อไอโซเลต CL2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

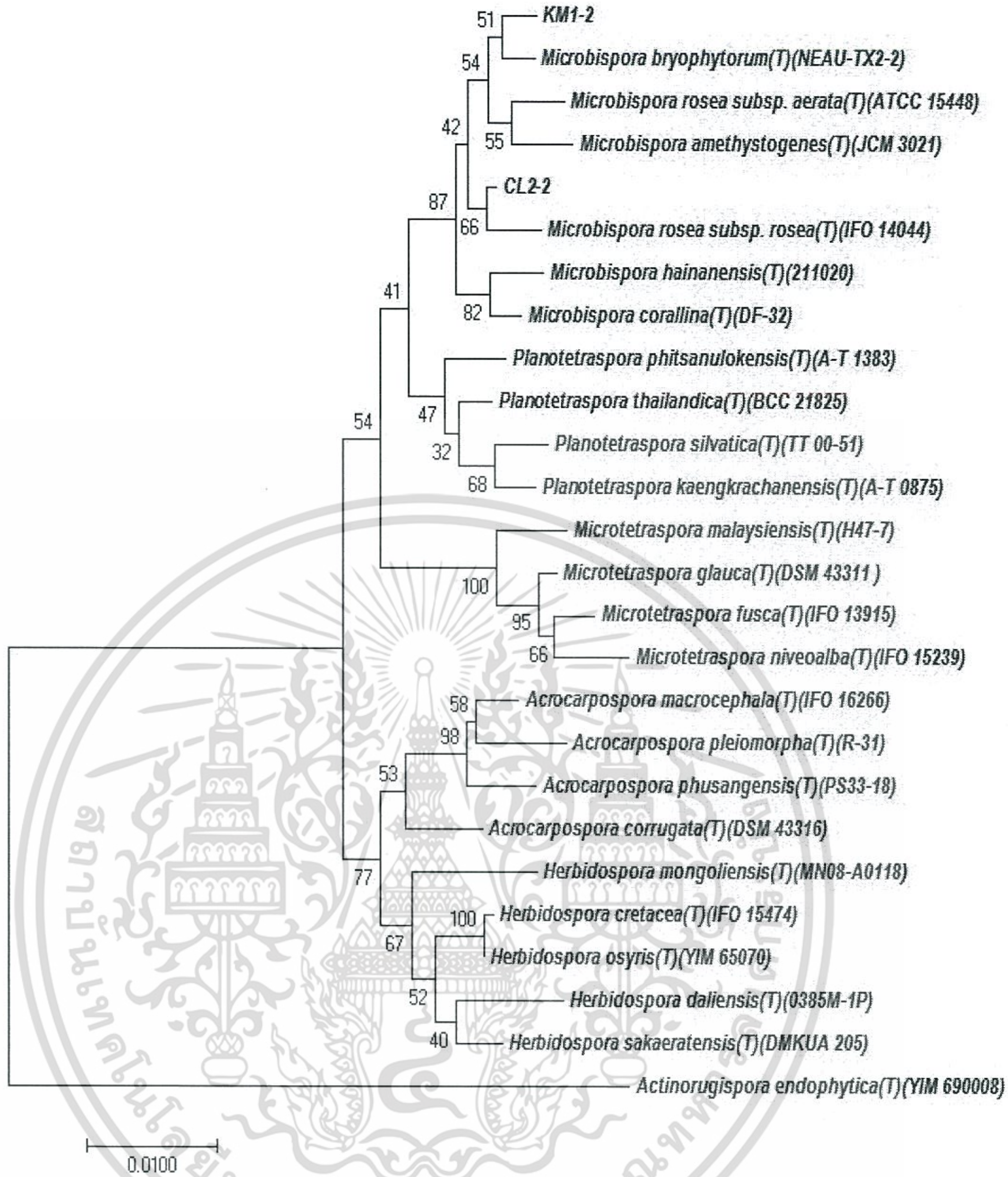
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต CL2-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic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



รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CL2-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

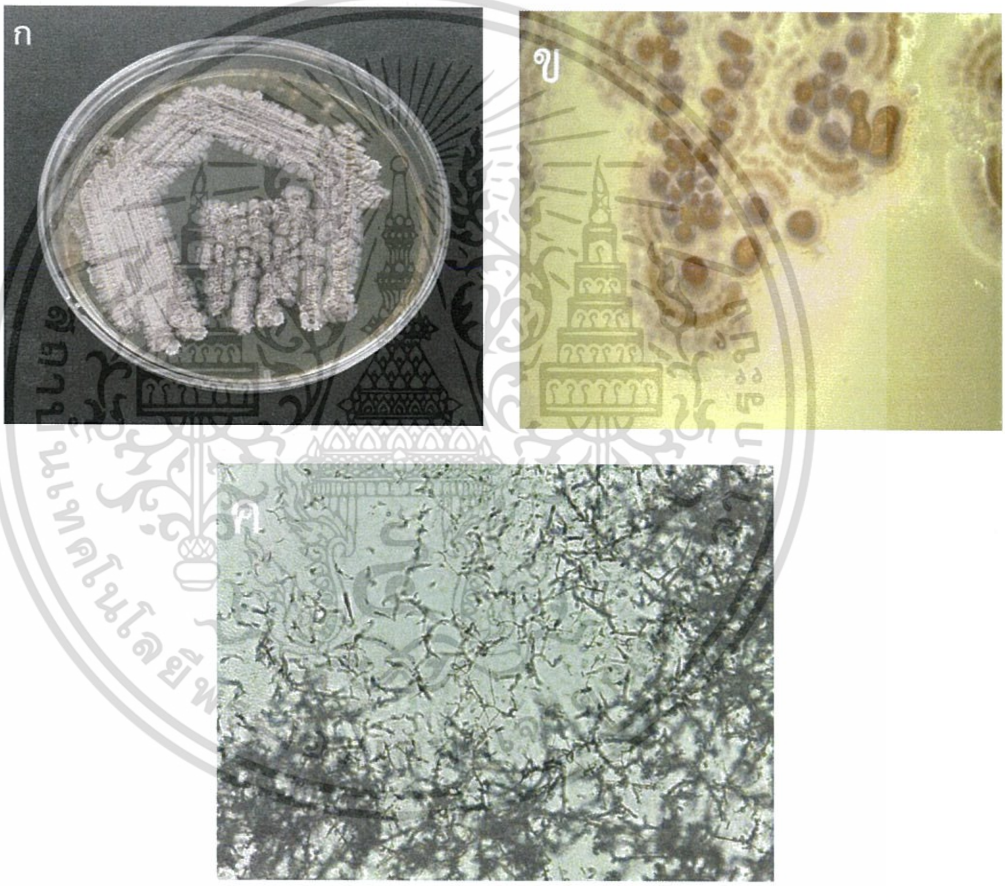


รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL2-2 และ KM1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method

(5) เชื้อไอโซเลต CS-R-4

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

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



รูปที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CS-R-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

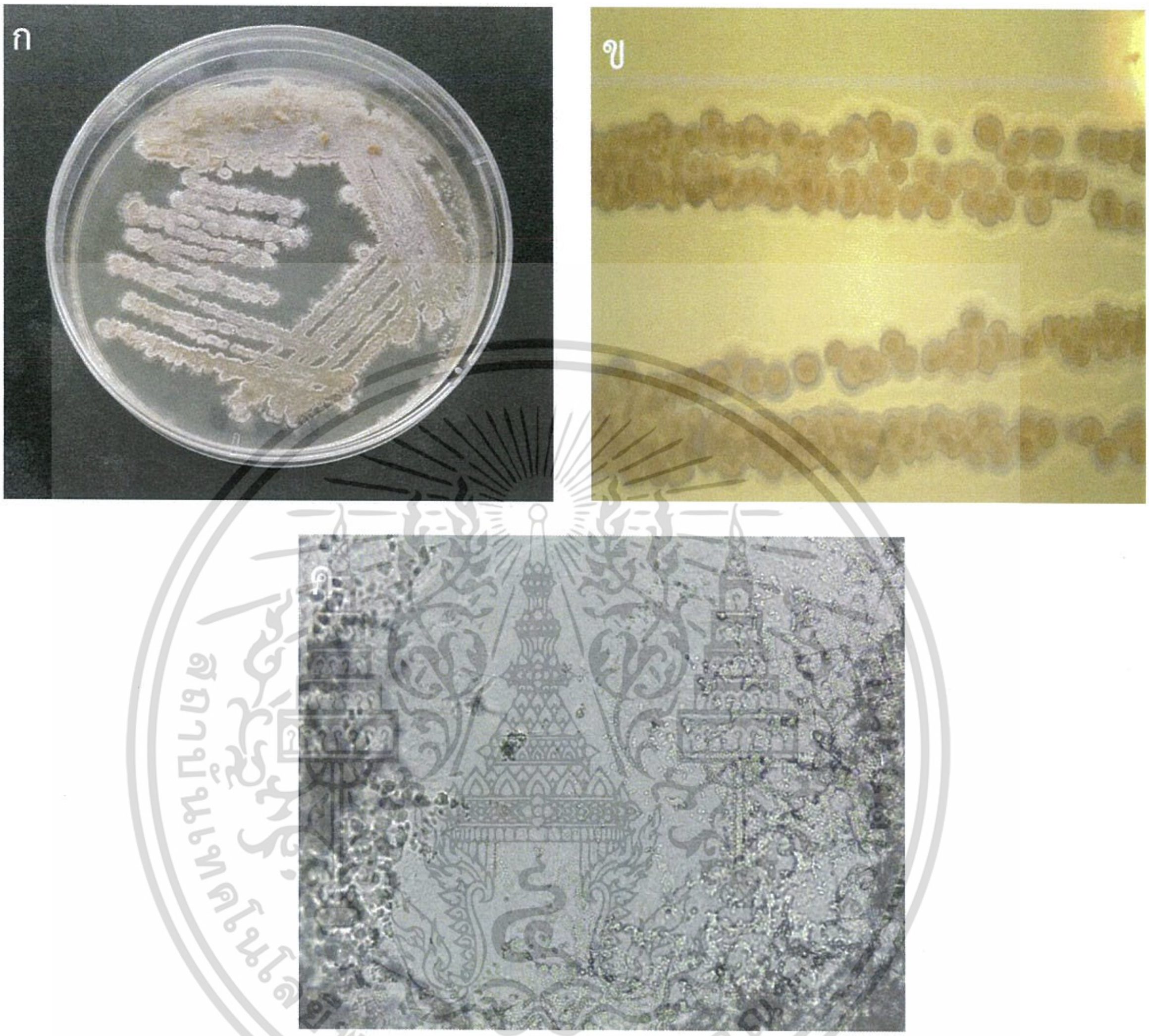
(6) เชื้อไอโซเลต KE1-2

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

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

<u>ลักษณะทางจีโนไทป์</u>

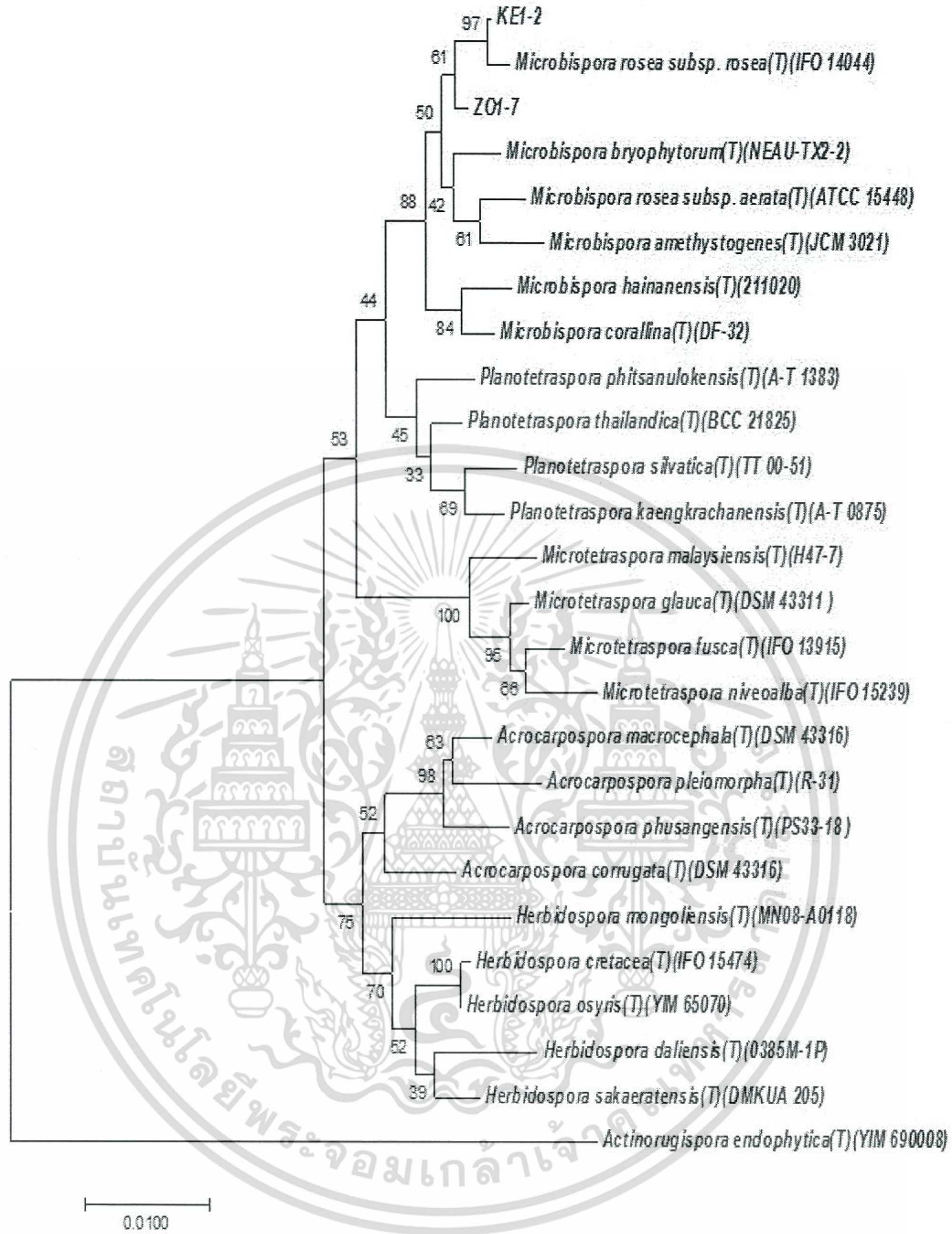
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต KE1-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.6% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic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



รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

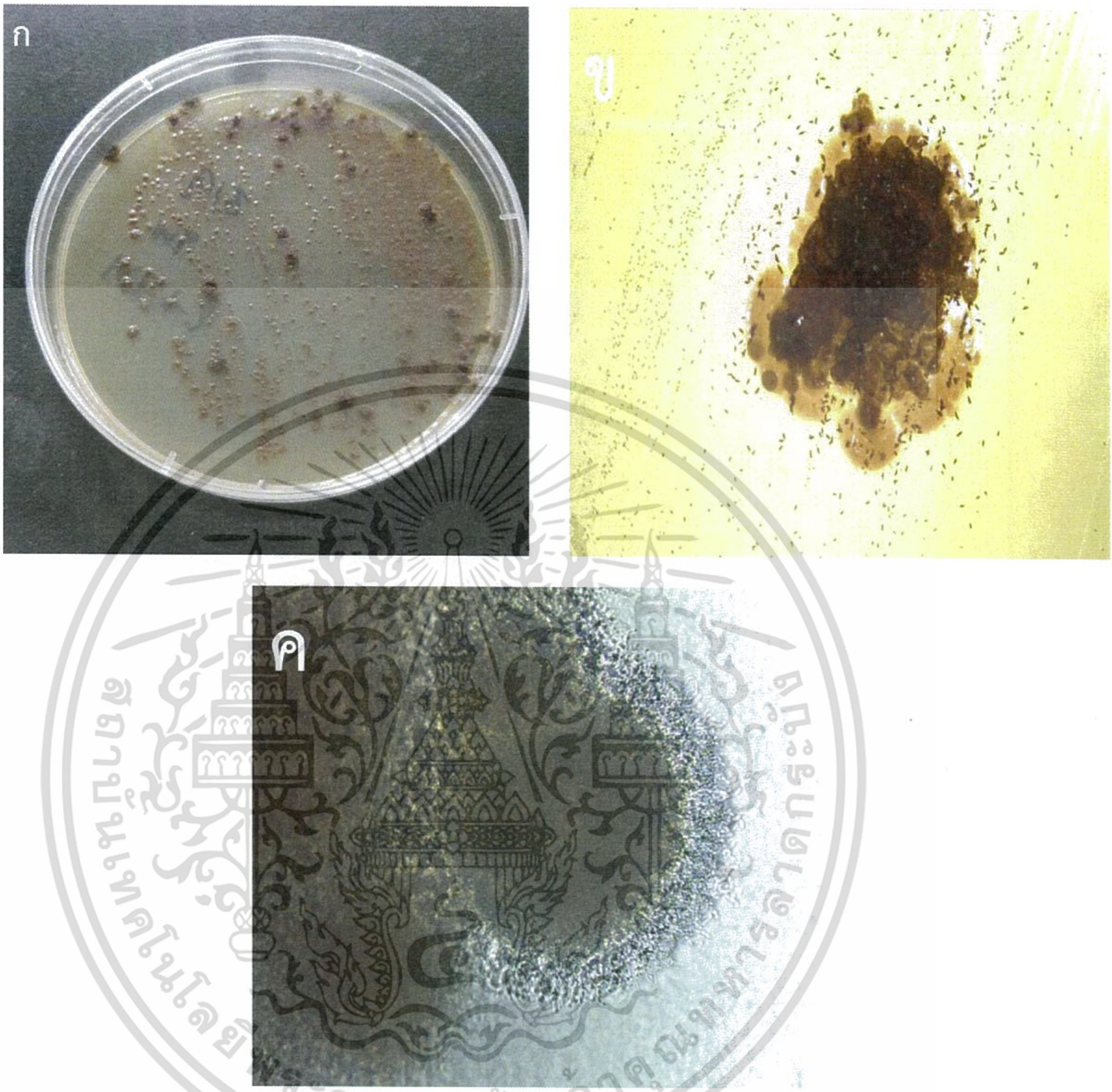
(7) เชื้อไอโซเลต KE1-3

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

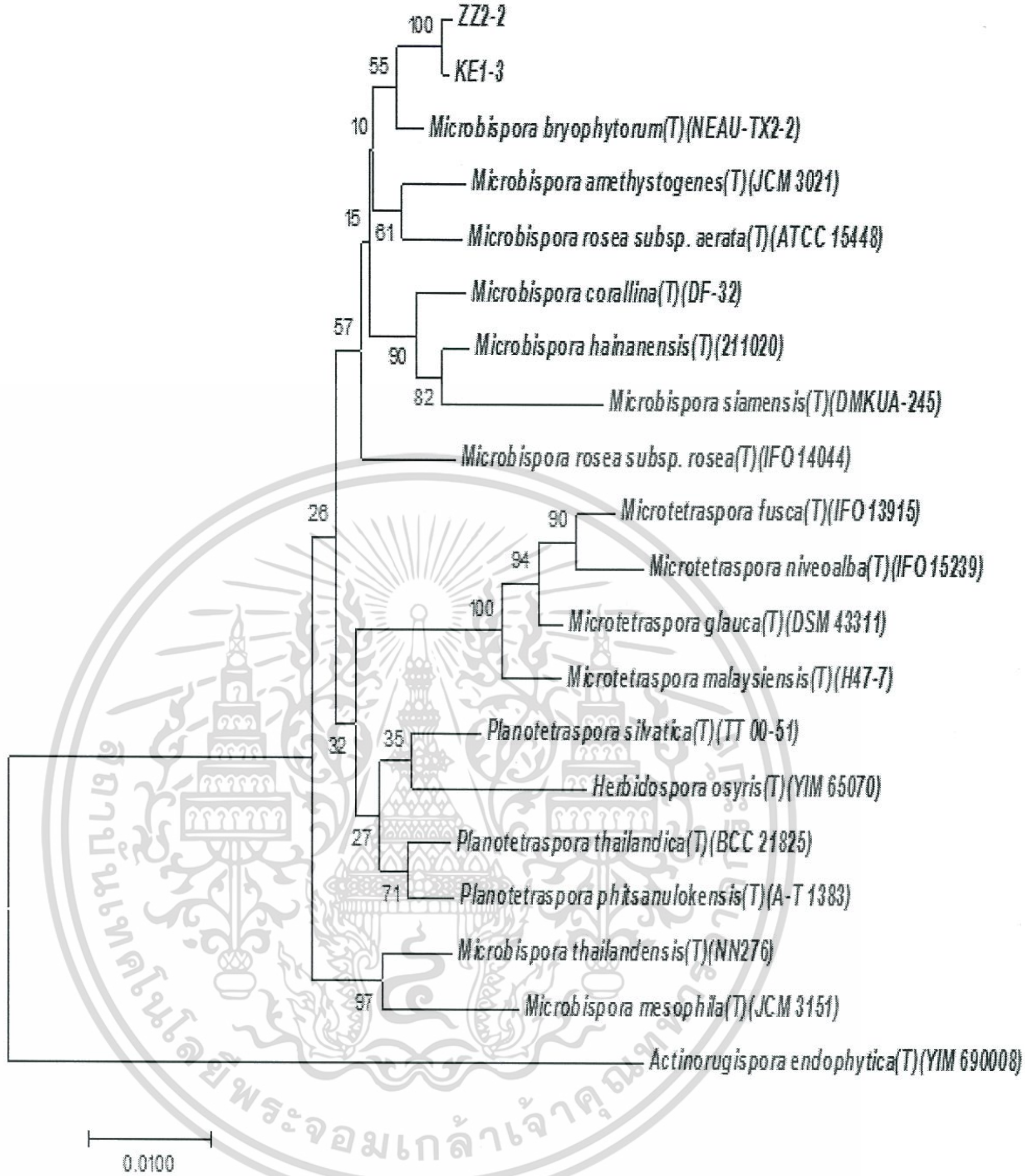
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต KE1-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE1-3

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

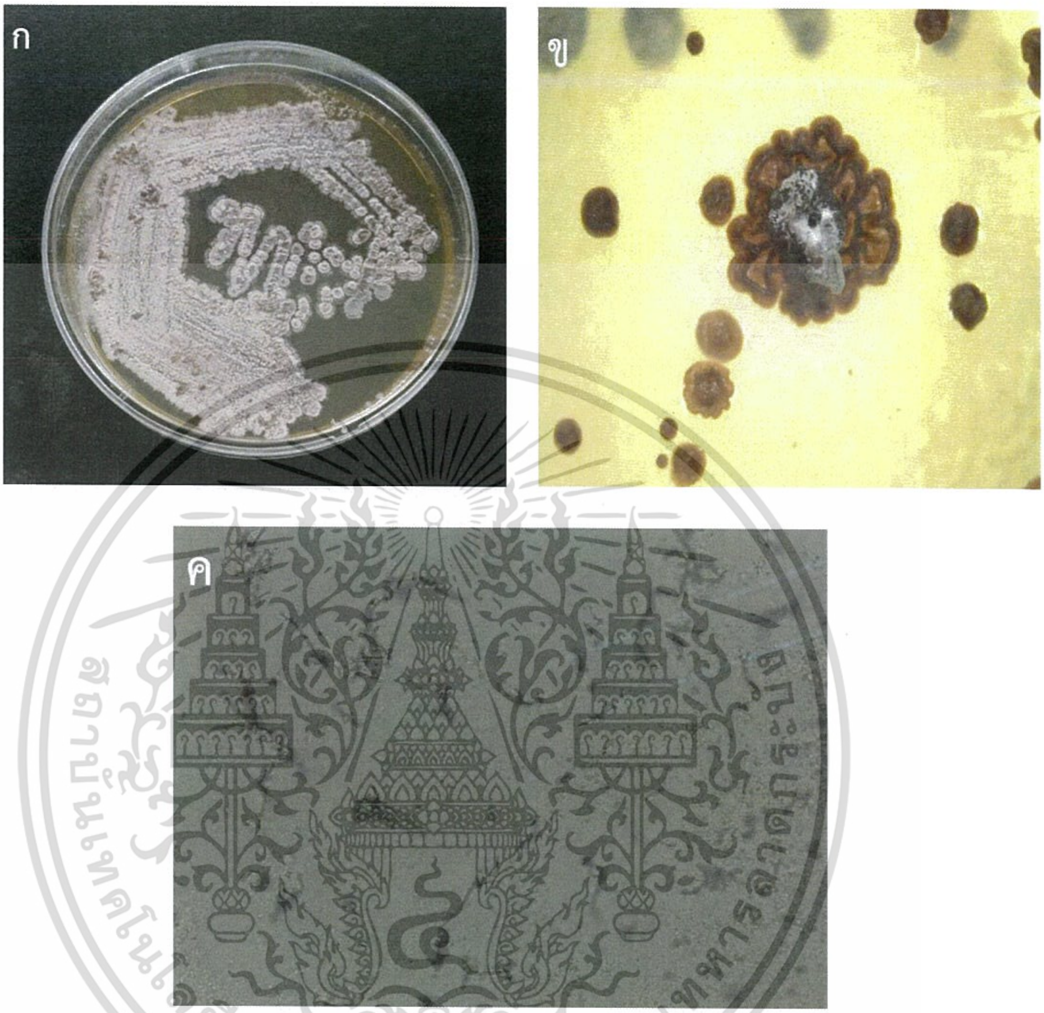
(8) เชื้อไอโซเลต KE2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

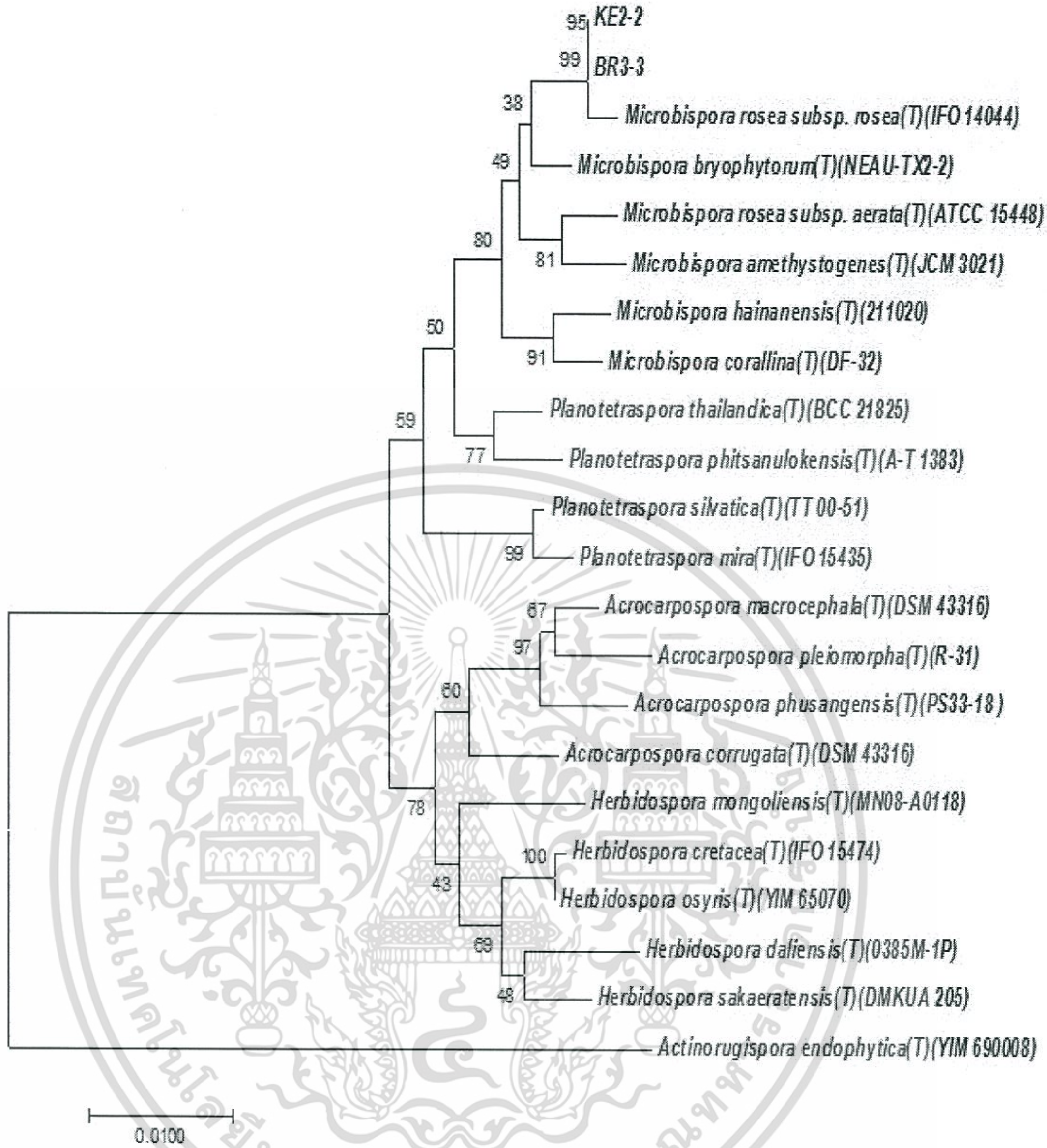
เชื้อไอโซเลต KE2-2 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.14 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอ่อนอมเหลือง (moderate orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเข้ม (strong orange) บนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.14 ก และ ข) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร **ISP2** ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่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

ลักษณะทางจีโนไทป์

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



รูปที่ 4.14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-2
(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)



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

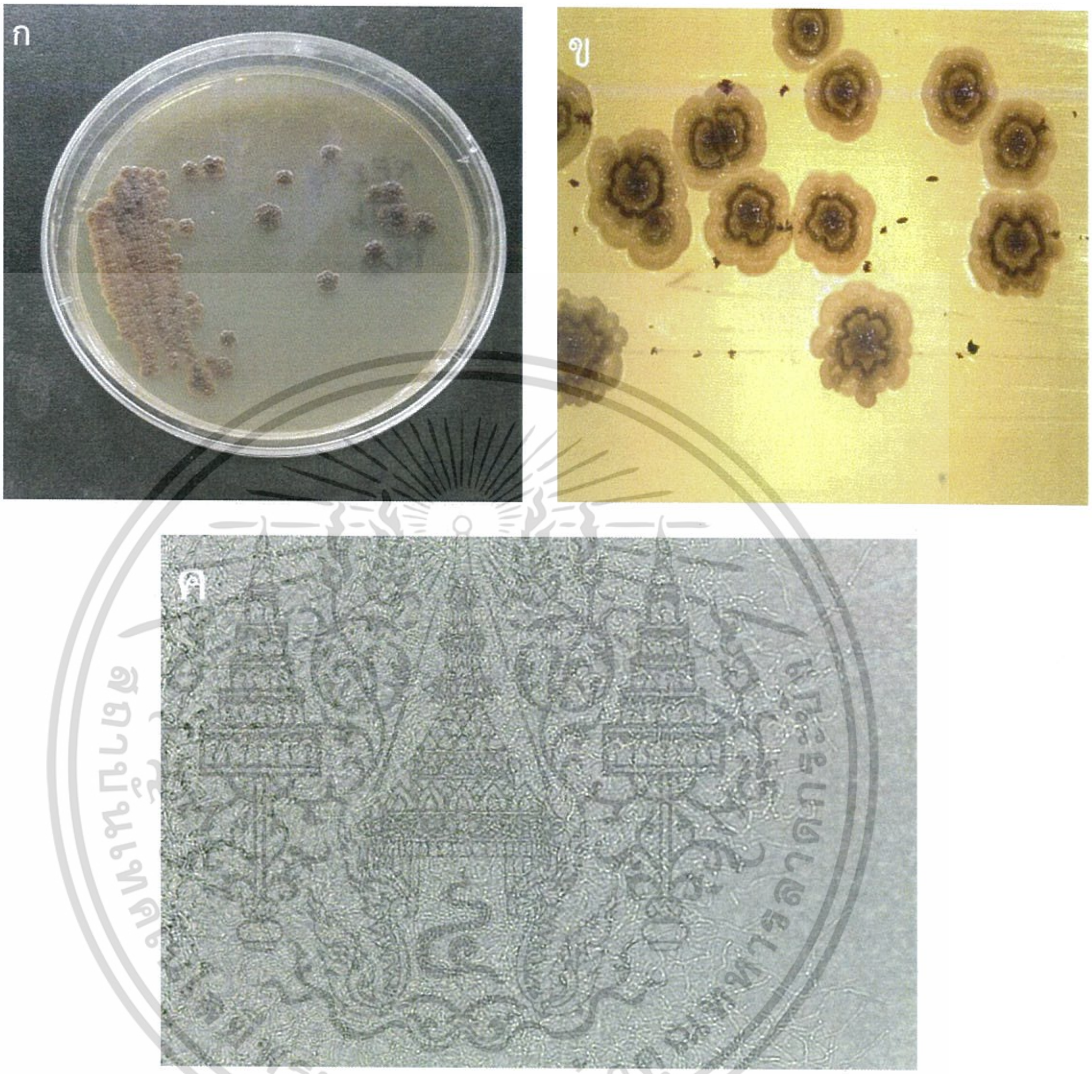
(9) เชื้อไอโซเลต KE2-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

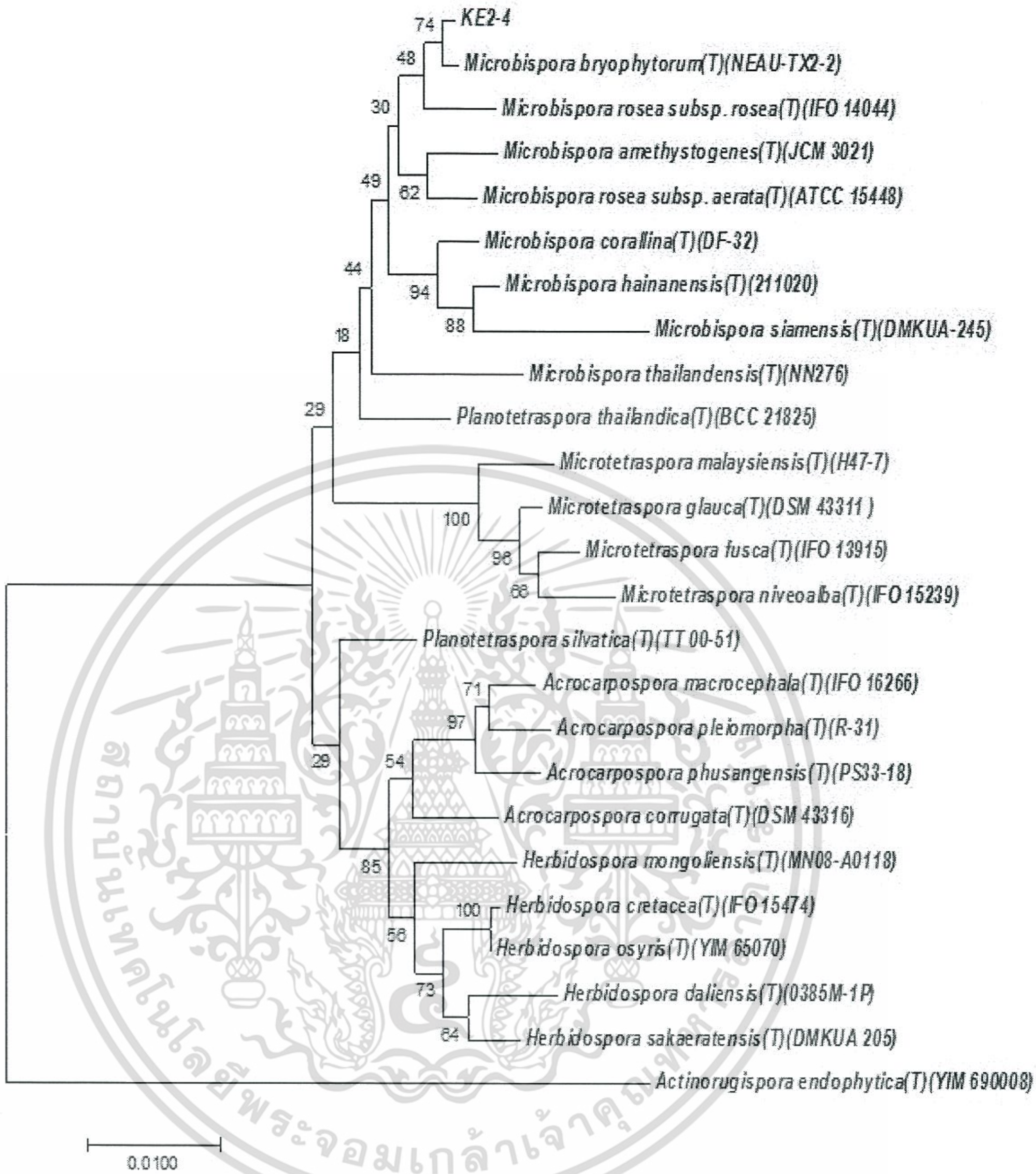
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต KE2-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.1% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic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



รูปที่ 4.16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

(10) เชื้อไอโซเลต KE2-5

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

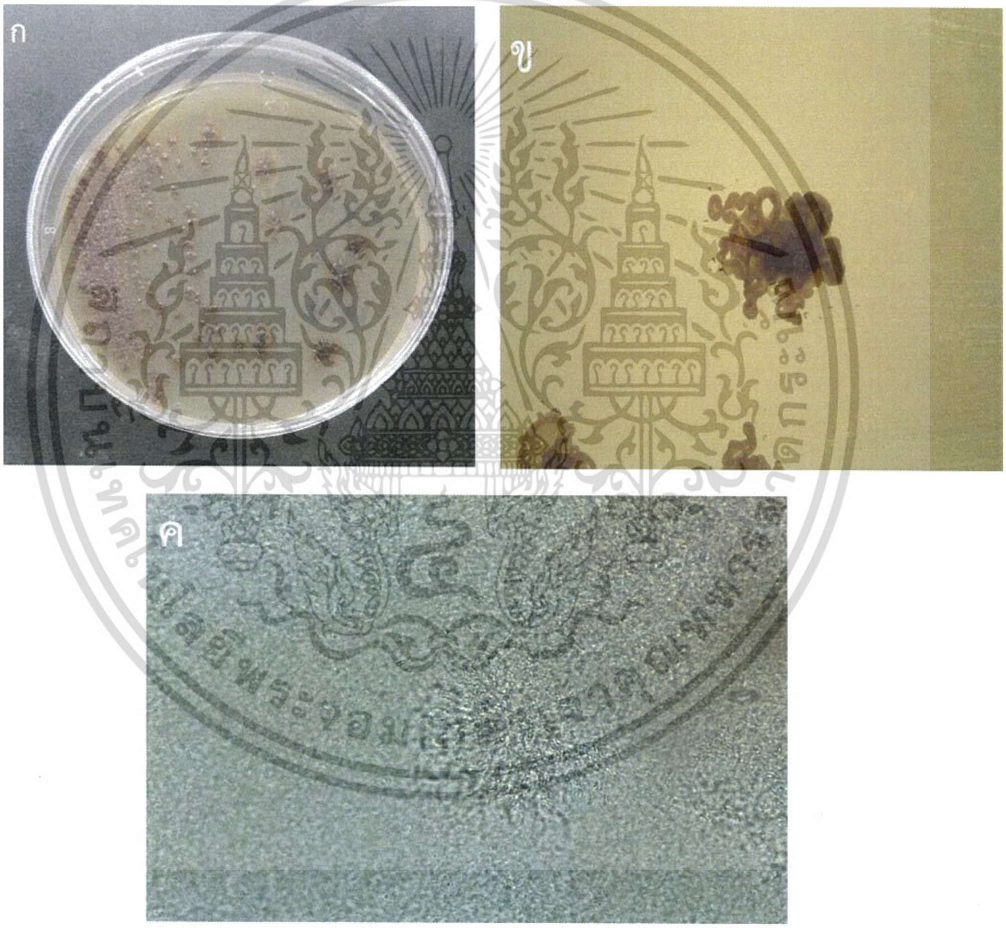
เชื้อไอโซเลต KE2-5 สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่ (รูปที่ 4.18 ค) สร้างเส้นใยอาหารสีค่อนข้างเหลืองสว่างอมน้ำตาลอ่อน (light yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีส้มอ่อนเหลืองอ่อน (pale orange yellow) และไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำบนอาหารทุกชนิด เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 7.3 (ภาคผนวก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

รูปที่ 4.18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KE2-5
(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

(11) เชื้อไอโซเลต KK1-10

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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



รูปที่ 4.19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KK1-10
(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

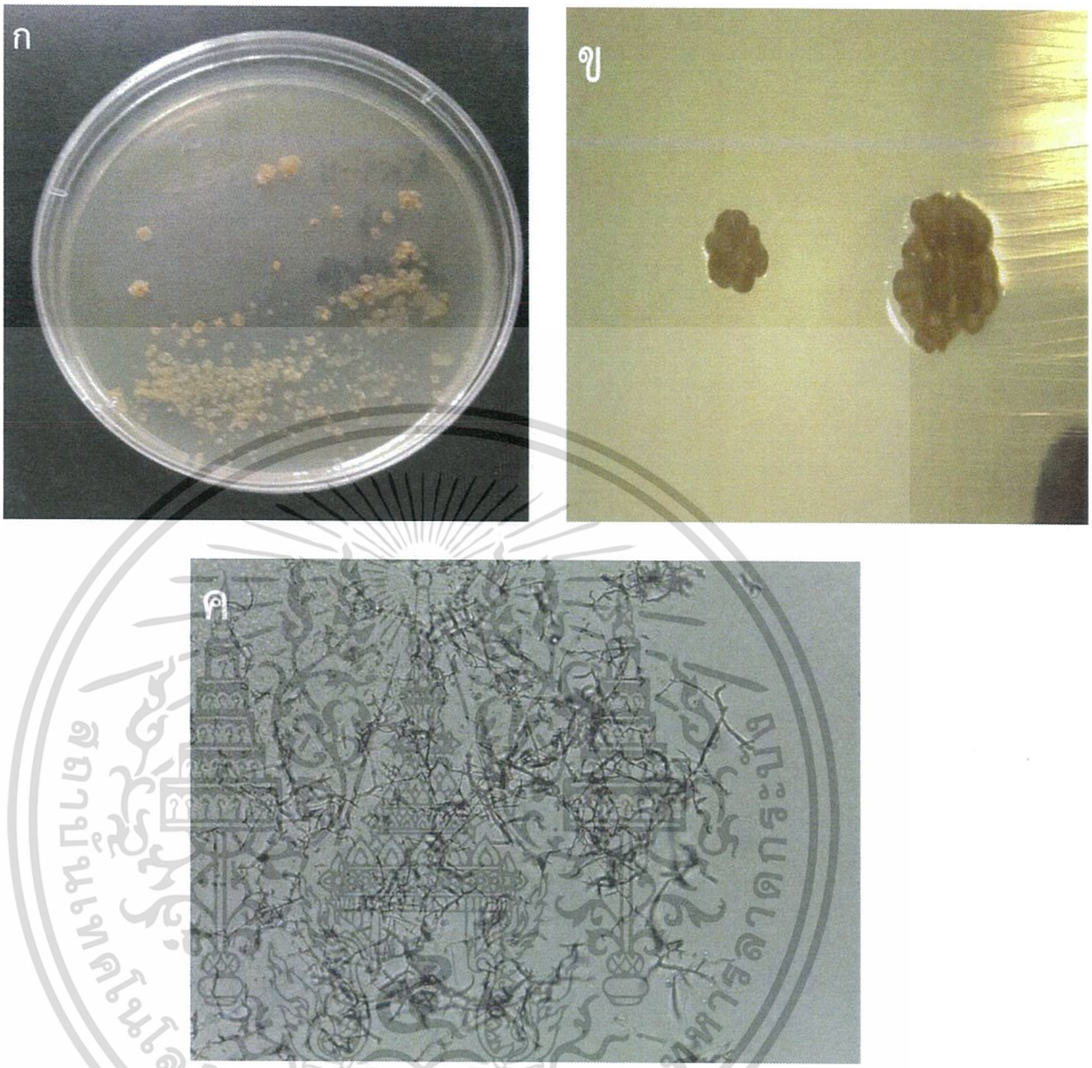
(12) เชื้อไอโซเลต KK1-11

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

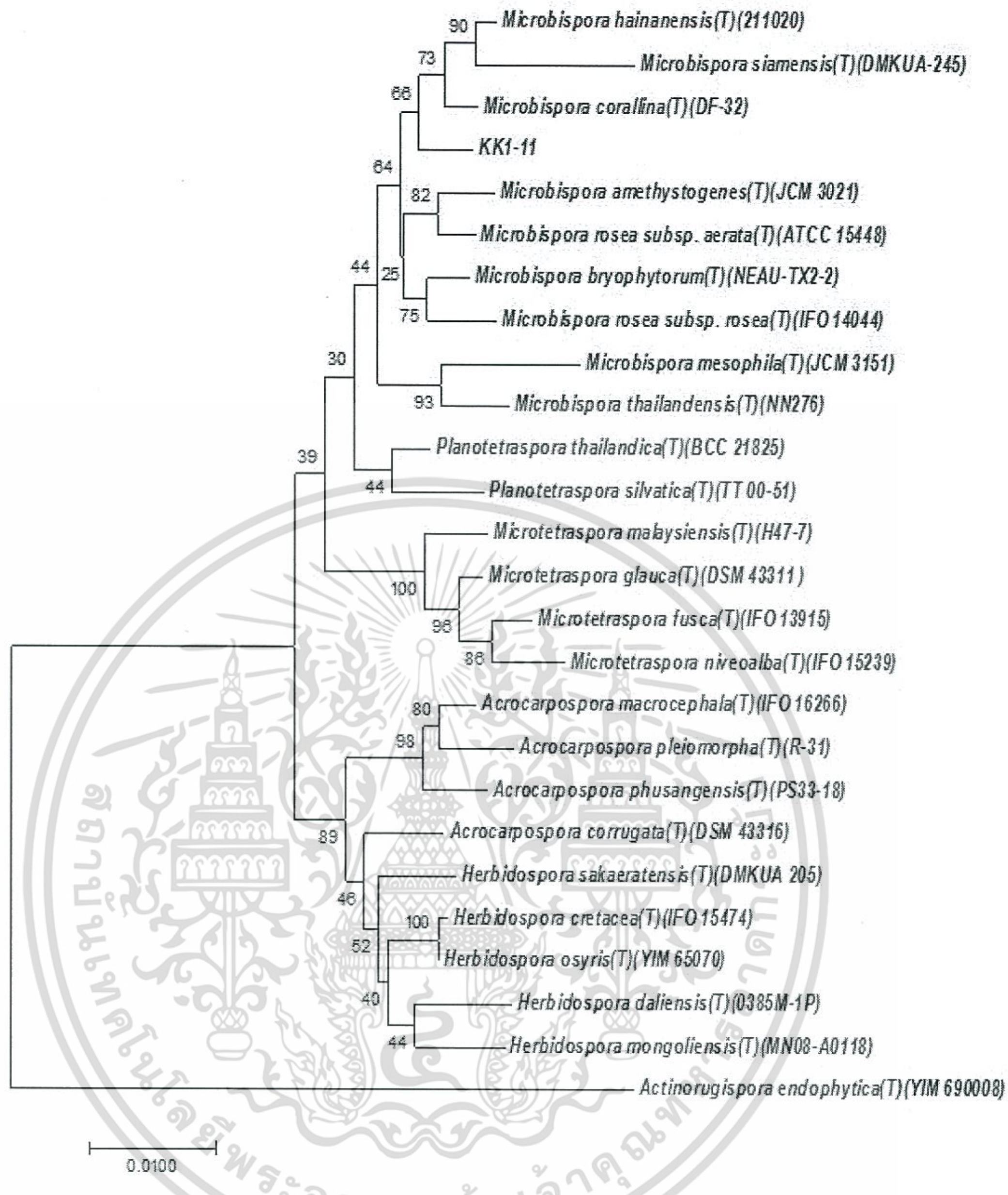
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต KE2-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KK1-11

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

(13) เชื้อไอโซเลต KM1-1

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

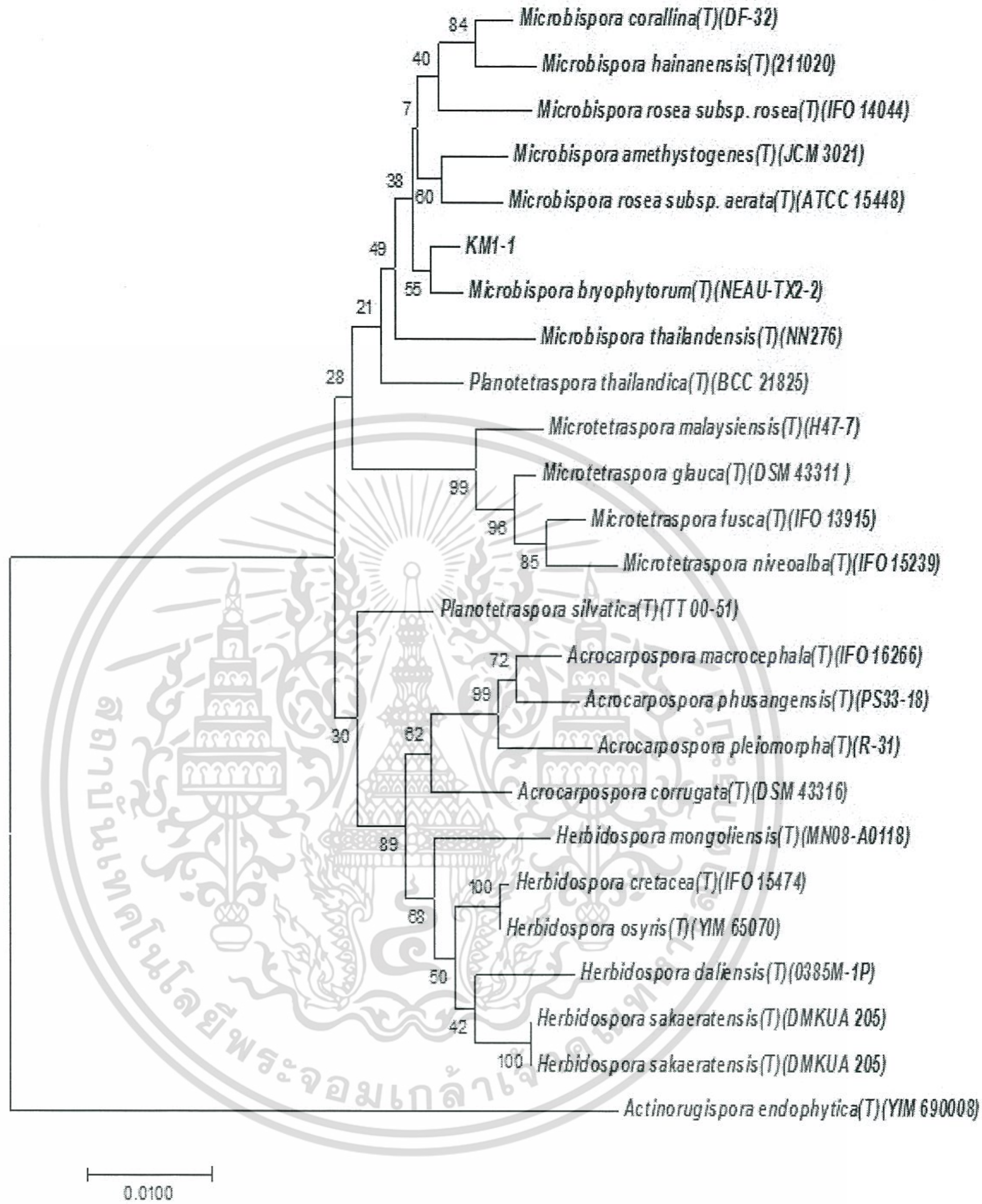
ลักษณะทางจีโนไทป์

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

รูปที่ 4.22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-1

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

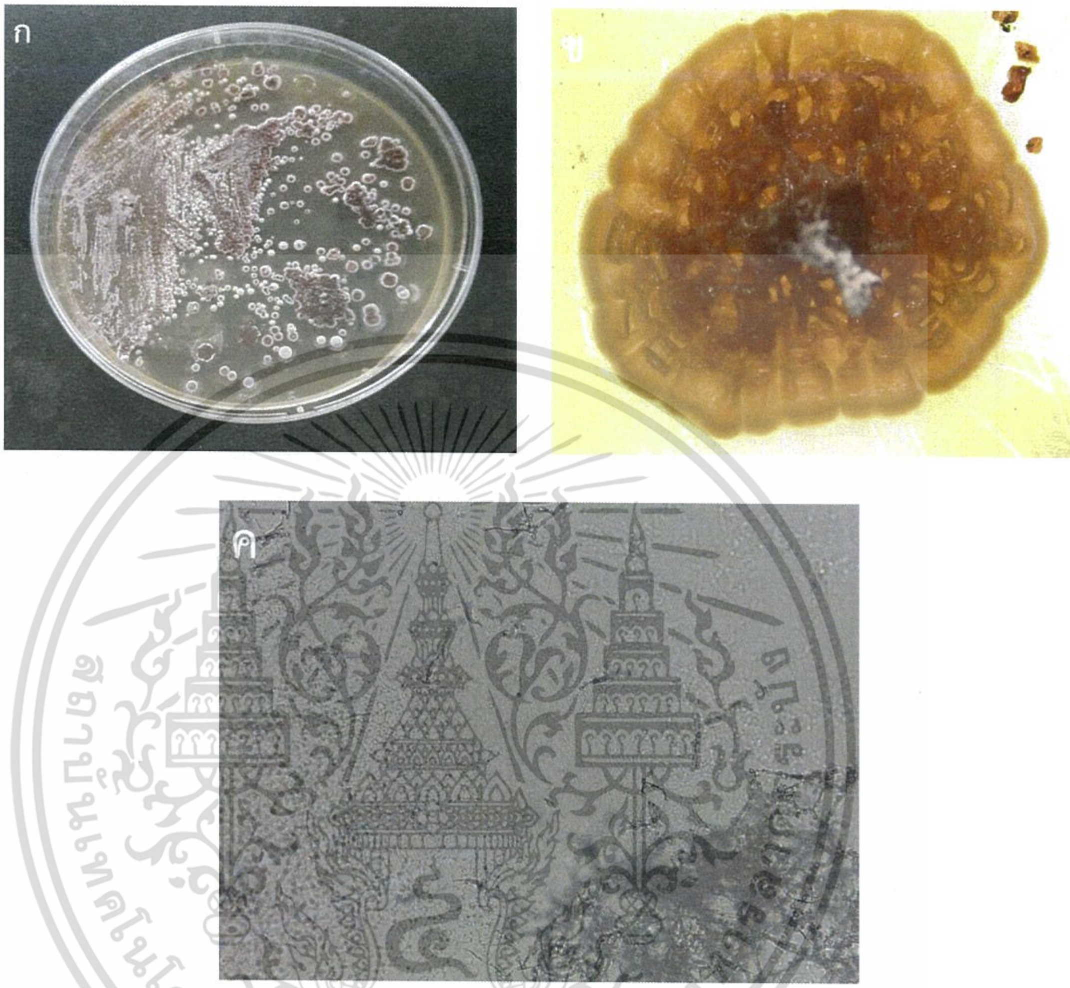
(14) เชื้อไอโซเลต KM1-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

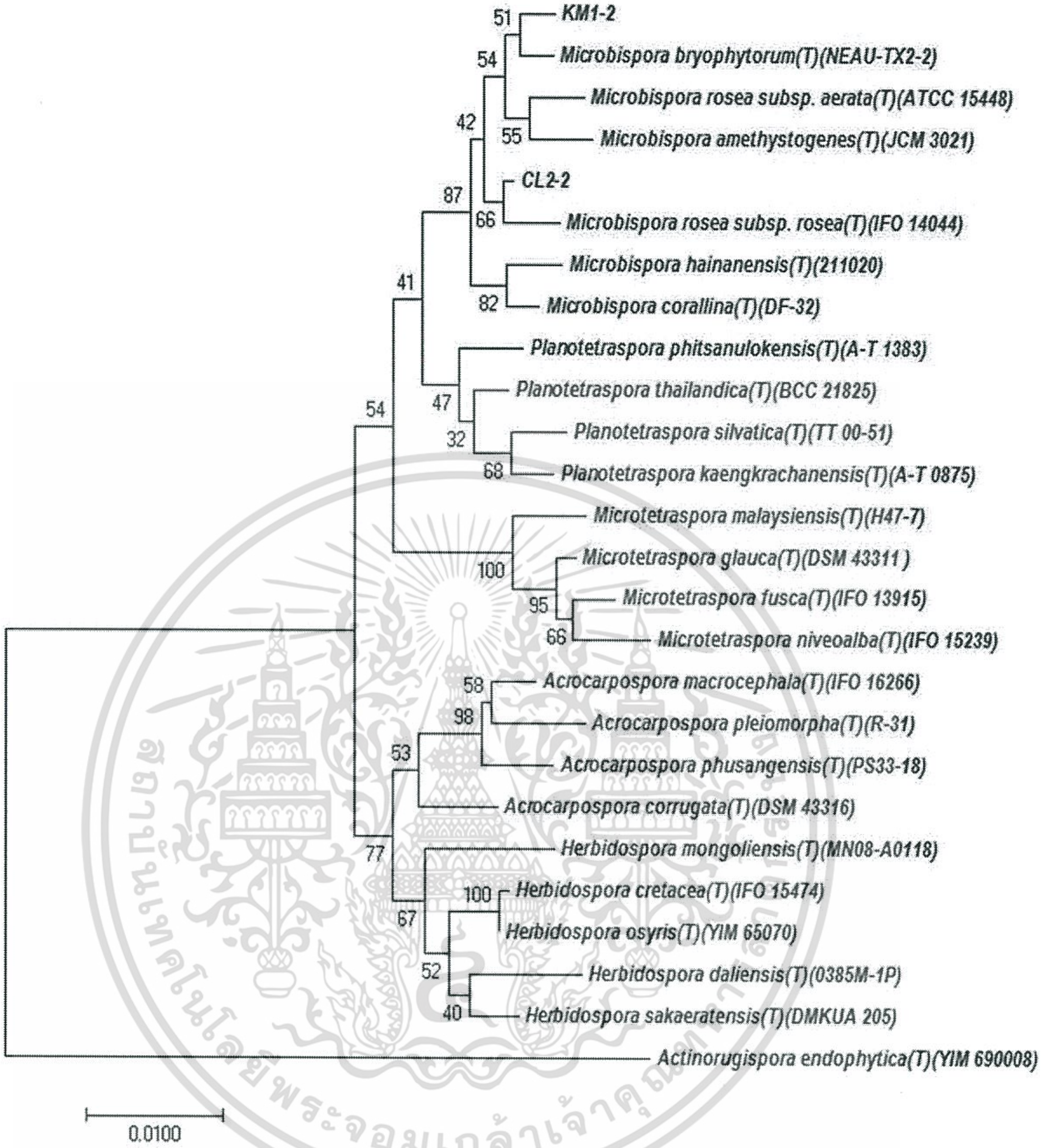
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต KM1-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 100% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.24 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KM1-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

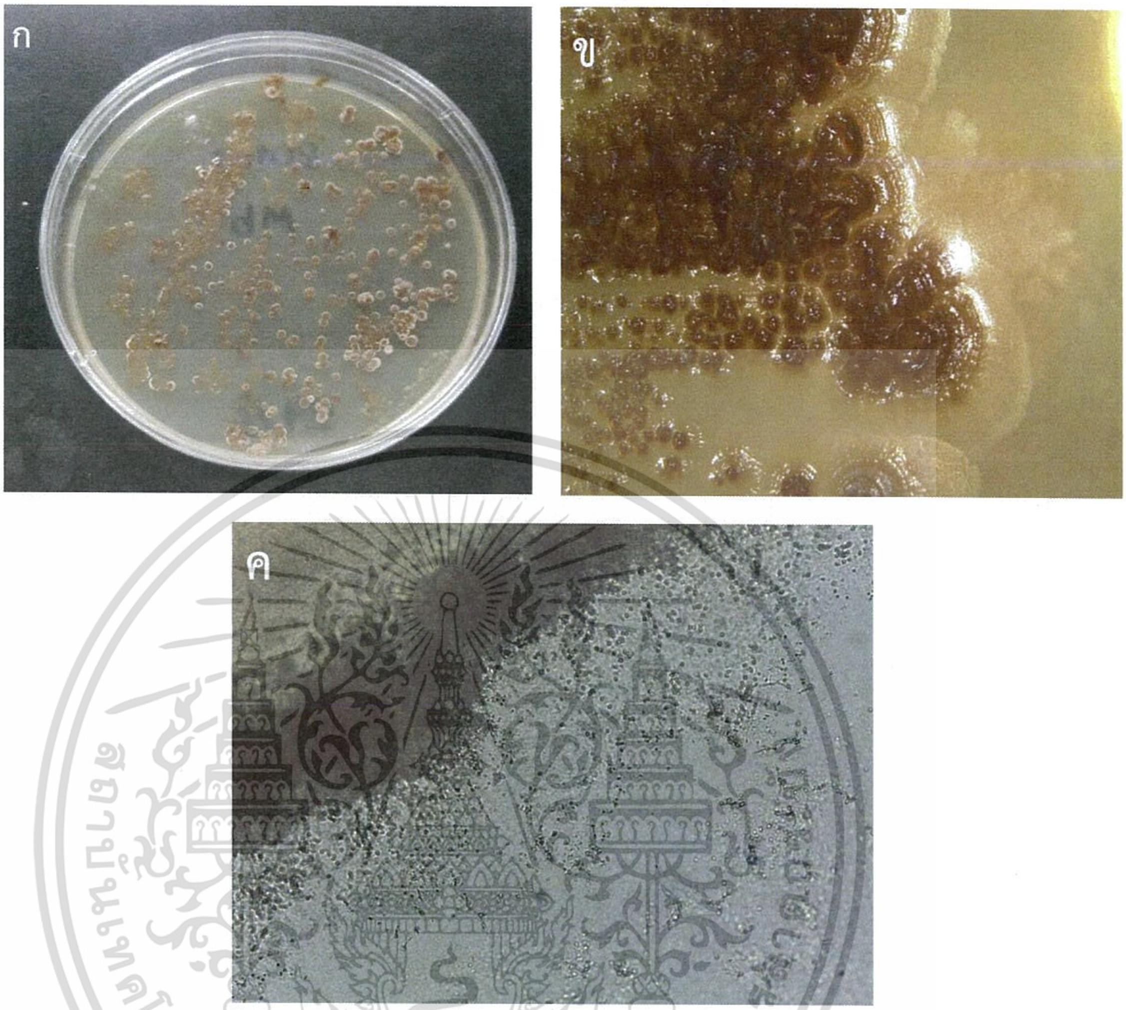
(15) เชื้อไอโซเลต ZO1-7

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

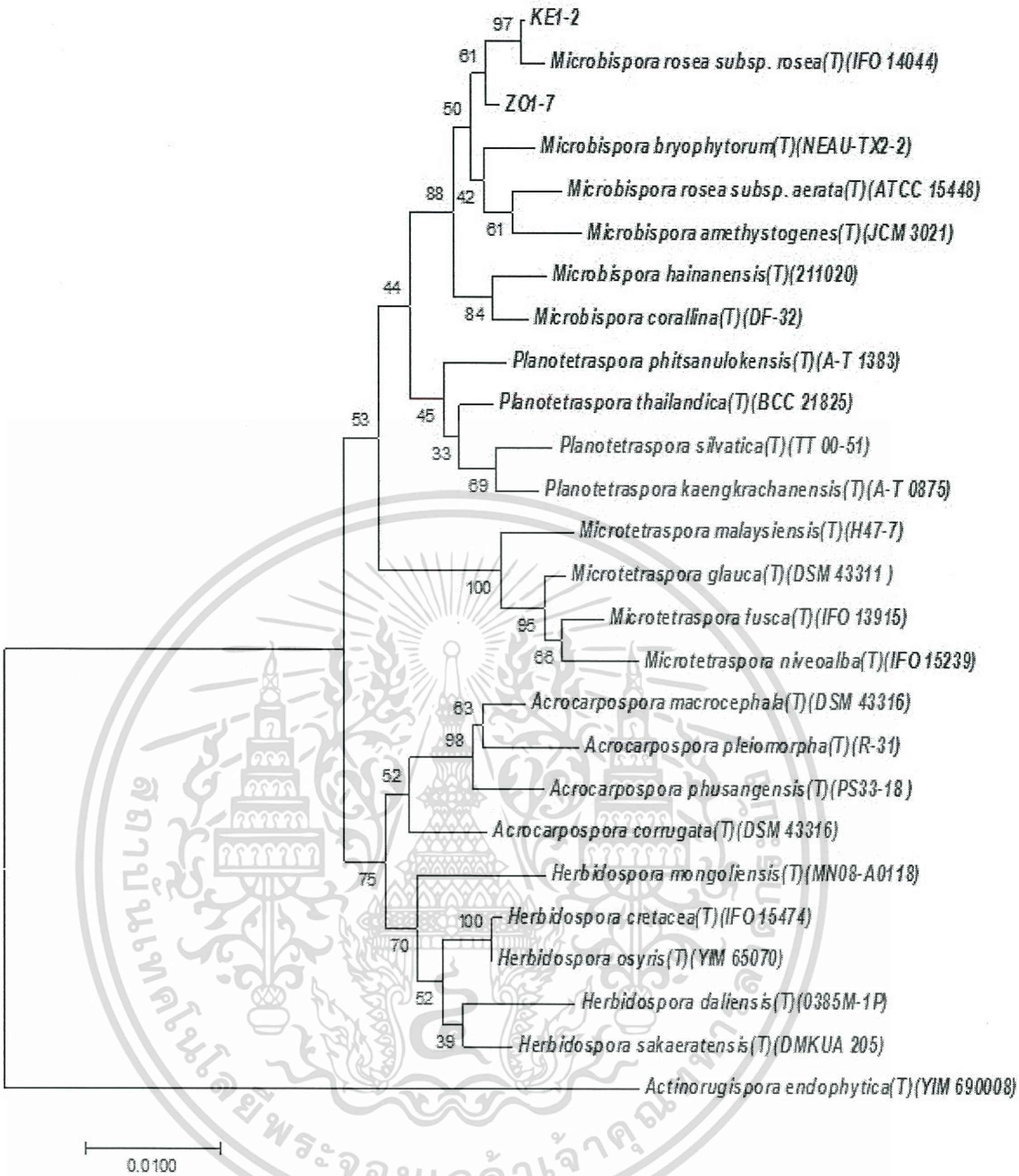
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต ZO1-7 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea subsp. rosea* IFO 14044 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.4% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic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



รูปที่ 4.26 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZO1-7

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

(16) เชื้อไอโซเลต ZZ-H-4

<u>ลักษณะทางฟีโนไทป์</u>

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

รูปที่ 4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ-H-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

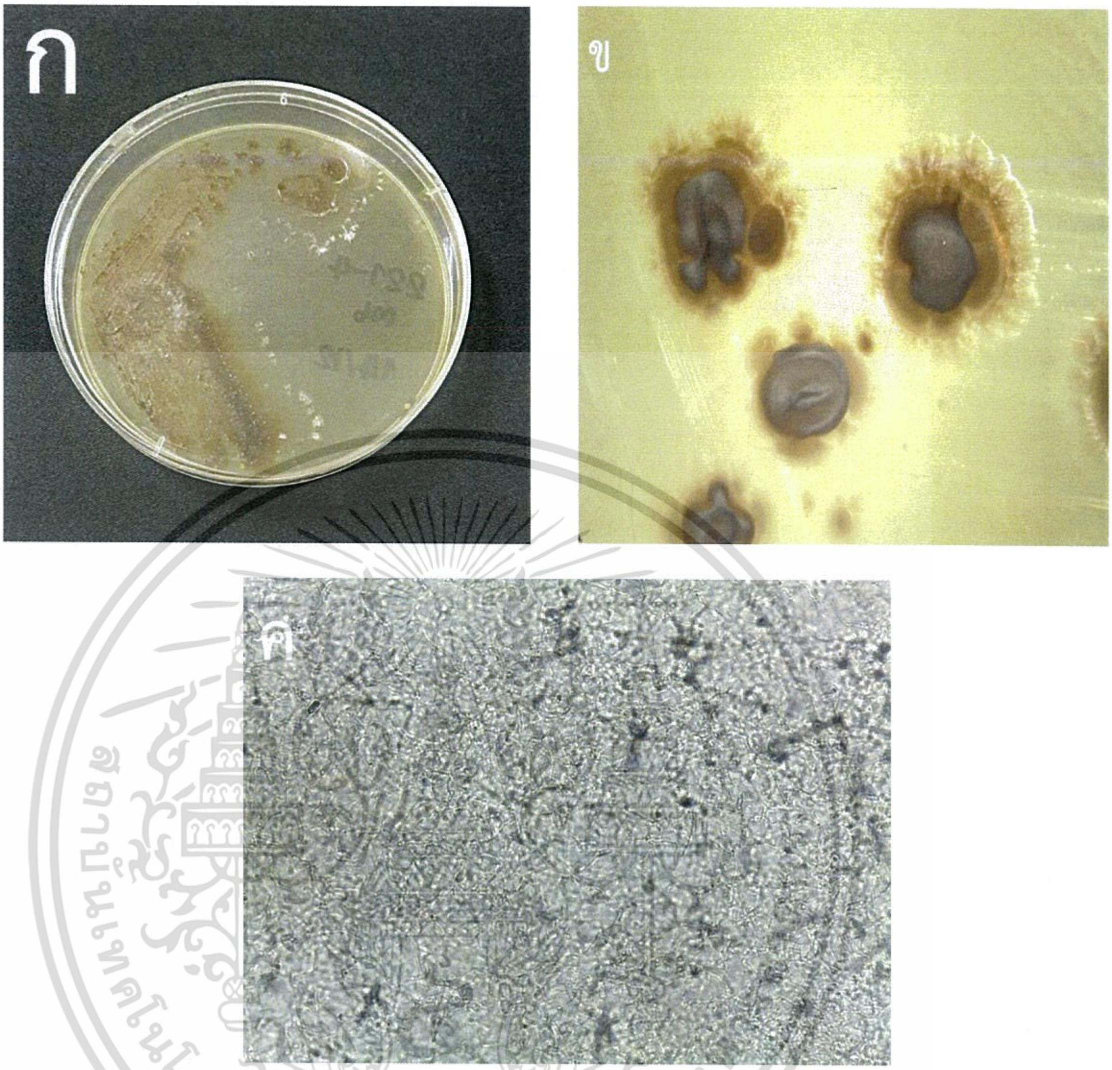
(17) เชื้อไอโซเลต ZZ1-4

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

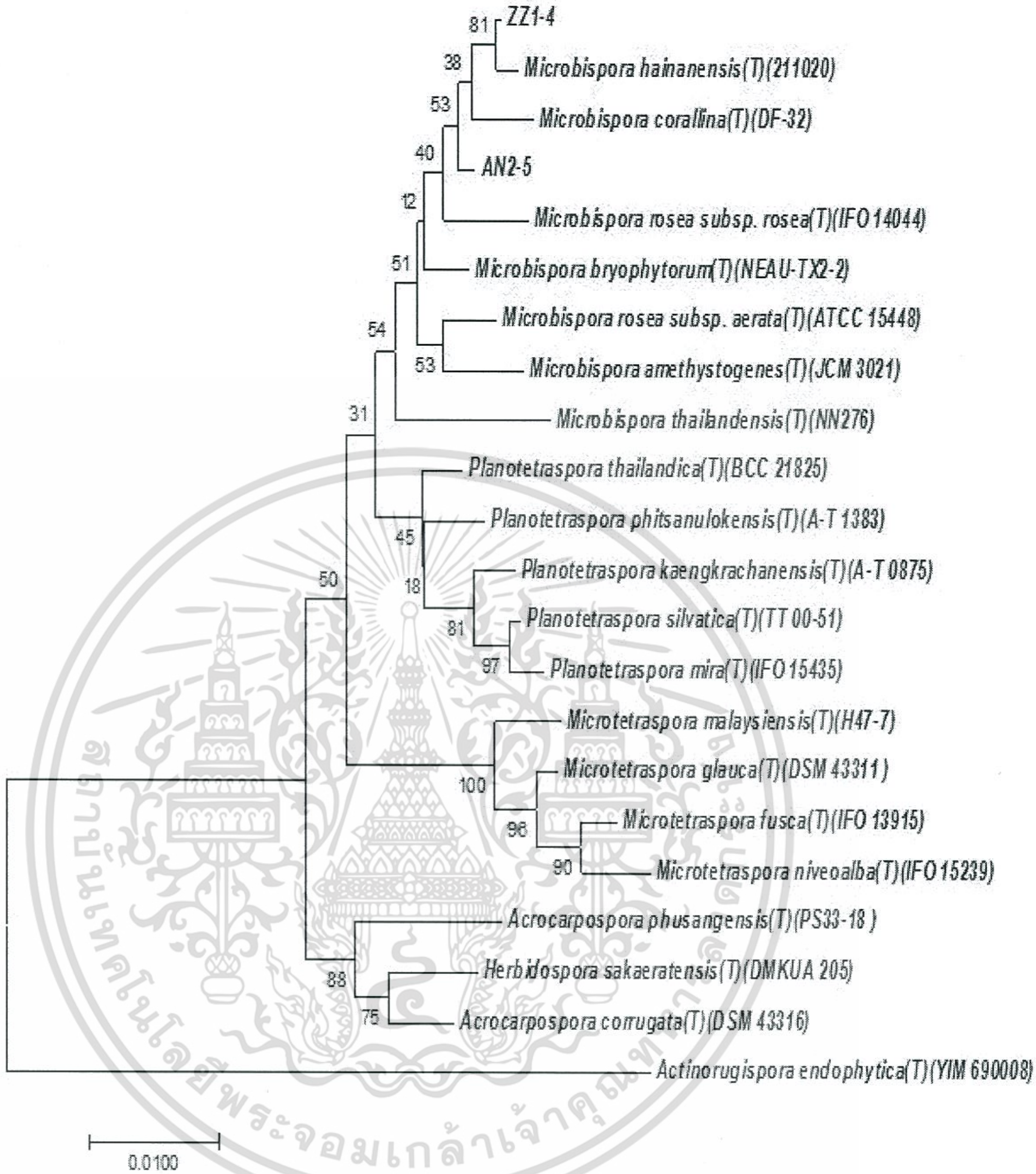
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต ZZ1-4พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.4% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ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



รูปที่ 4.28 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ1-4

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

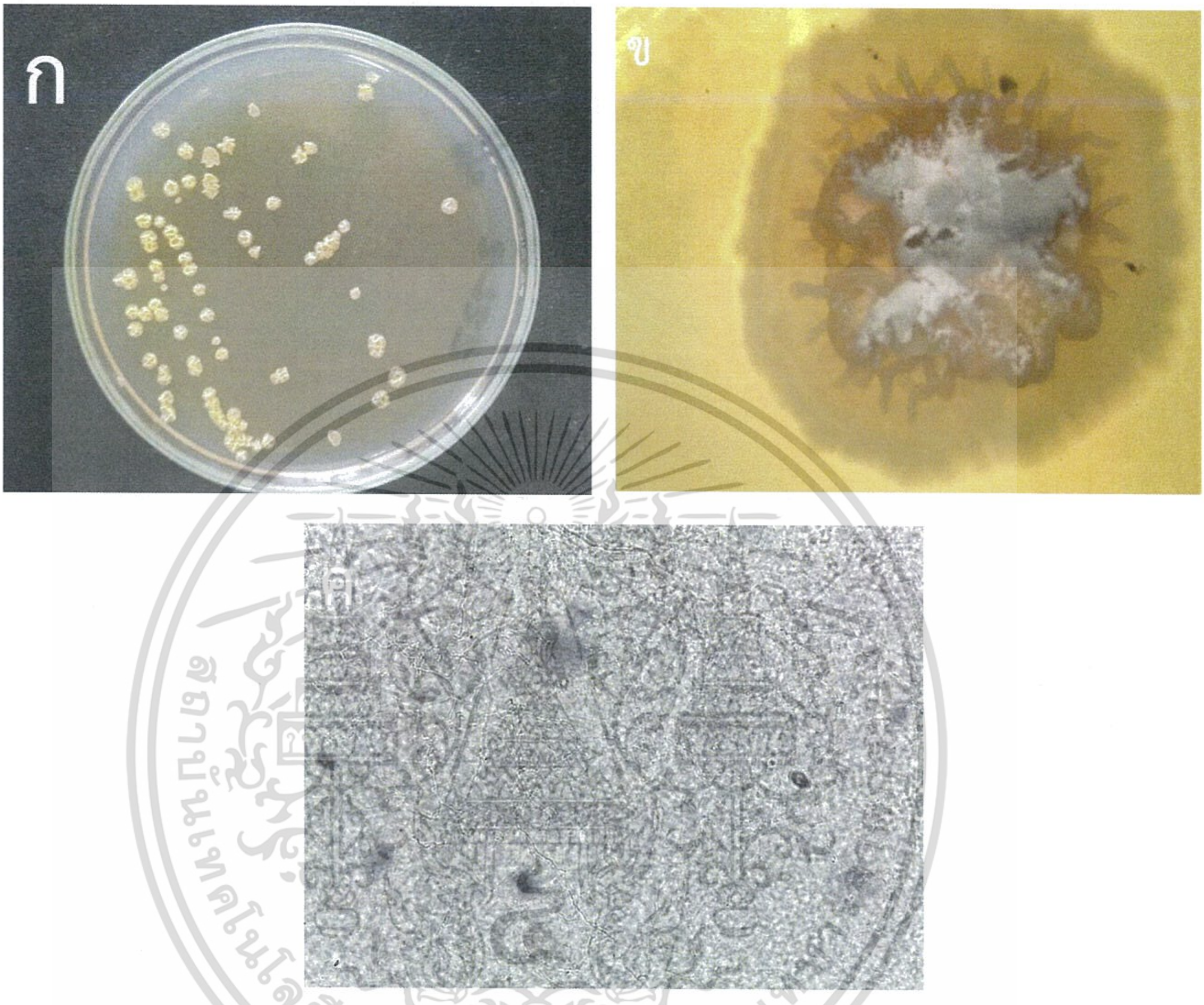
(18) เชื้อไอโซเลต ZZ2-2

ลักษณะทางฟีโนไทป์

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

ลักษณะทางจีโนไทป์

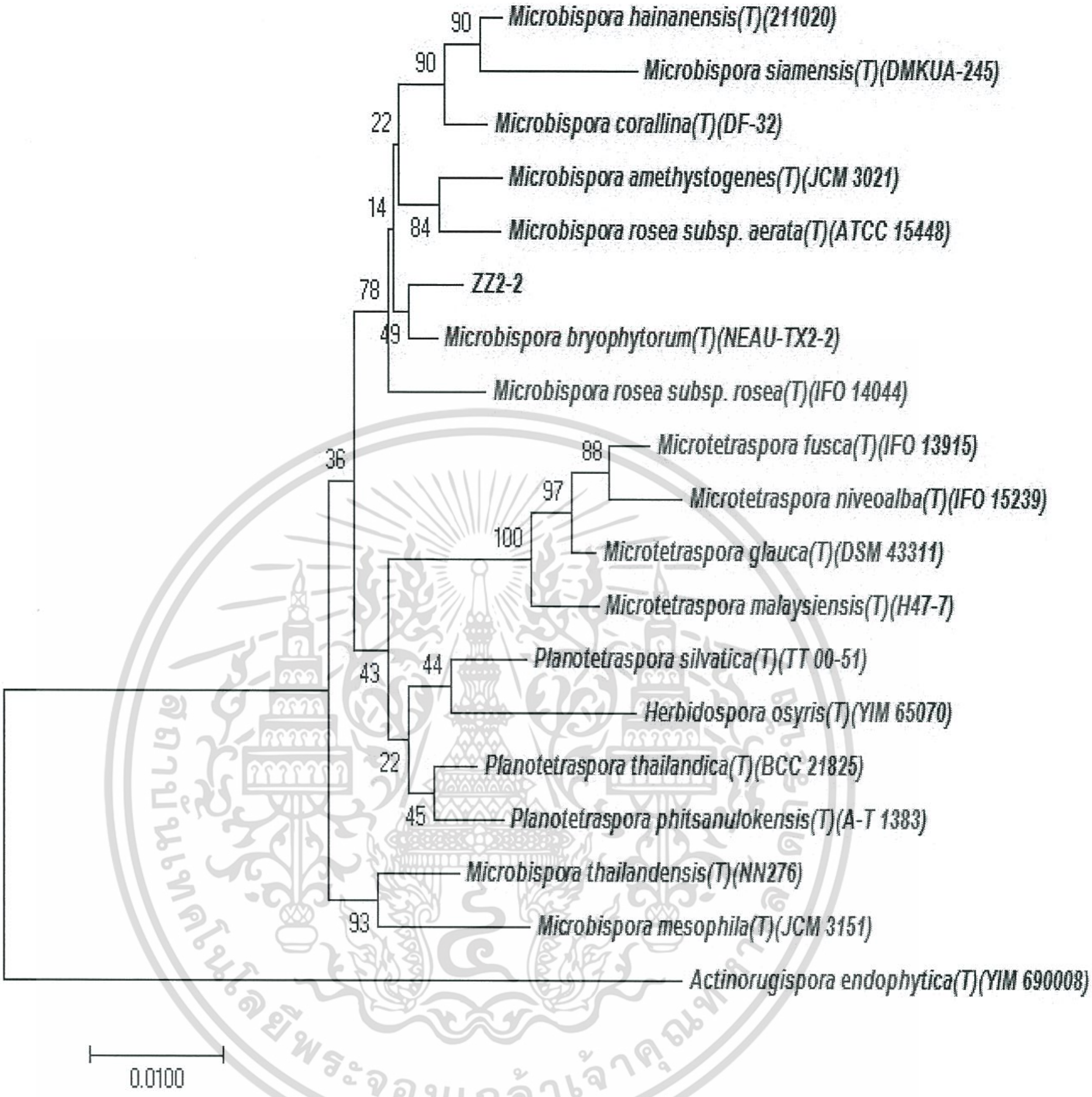
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อไมโครไบสปอราไอโซเลต ZZ1-4พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.4% **(ภาคผนวก ค)** ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree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



รูปที่ 4.31 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต ZZ2-2

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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



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

4.2 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเชื้อไมโครไบสปอรา

นำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตจากน้ำหมักของเชื้อไมโครไบสปอราที่คัดเลือก มาทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทดังนี้

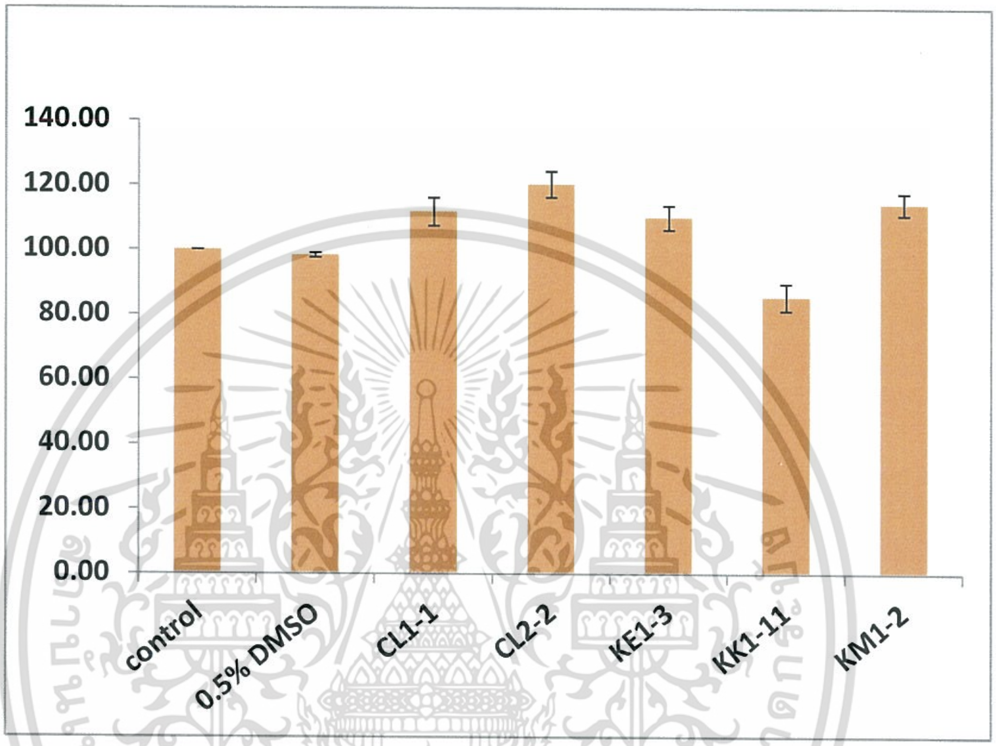
4.2.1 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

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

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL

รหัสเชื้อ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าความคาดเคลื่อน
CL1-1	104.63	111.34	119.40	111.79	4.27
CL2-2	123.15	112.37	125.37	120.30	4.01
KE1-3	106.48	117.53	105.97	109.99	3.77
KK1-11	87.04	91.75	77.61	85.47	4.16
KM1-2	117.59	117.53	107.46	114.19	3.37
o.5% DMSO	99.07	98.97	97.01	98.35	0.67
Control	100	100	100	100.00	0.00

ภาพที่ 4.33 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL



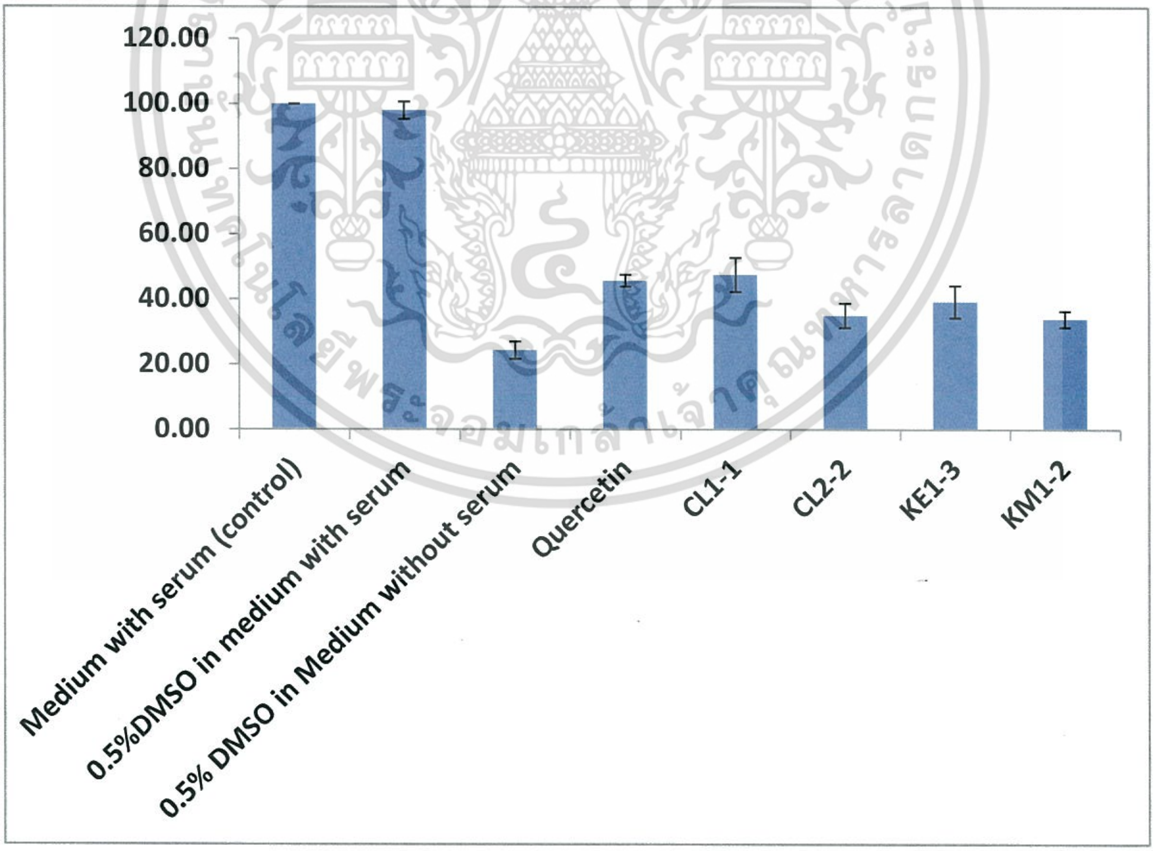
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท

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

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL

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

ภาพที่ 4.34 ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 1 ng/mL



*$p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสภาวะ oxidative stress

บทที่ 5
สรุปและวิจารย์ผลการทดลอง

จากการนำเชื้อไมโครไบสปอราที่แยกจากเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร ทั้ง 18 ไอโซเลต มาศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางจีโนไทป์ 16S rRNA gene สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่ทำการศึกษาทุกตัวเป็นเชื้อในสกุลไมโครไบสปอรา

การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 โดยการนำสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml จากเชื้อ 5 ไอโซเลต ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, KK1-11 และ KM1-2 พบว่าพบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ KK1-11 มีอัตราการรอดของเซลล์น้อยที่สุดคือ ร้อยละ 85.47 ซึ่งมีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์จึงไม่นำไปทดสอบต่อ ดังนั้นมีเพียงสารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 ที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต ร้อยละ111.79, ร้อยละ120.30, ร้อยละ109.99 และ ร้อยละ114.19 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา เมื่อคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท P19 จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบจากทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ CL1-1, CL2-2, KE1-3, และ KM1-2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/ml มาทำการทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท กับเซลล์ประสาท P19 ที่สภาวะ Oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อไมโครไบสปอรา เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control สามารถปกป้องเซลล์ประสาทได้ร้อยละ 47.58, ร้อยละ35.09, ร้อยละ39.31 และ ร้อยละ 33.99 ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดหยาบจาก KE1-3 ที่ถึงแม้ว่ามีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจาก CL1-1 มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ใกล้เคียงกับ positive control (Quercetin) มากที่สุด

จากงานวิจัยที่ศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในสภาวะ Oxidative stress (Bahareh Eftekharzadch และคณะ., 2010) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการทดลองในครั้งนี้โดยสามารถกล่าวได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลไมโครไบสปอราสามารถออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้

ข้อเสนอแนะ

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

และจากการศึกษาควรมีการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทเพิ่มเติมเพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านวิทยาศาสตร์และด้านสาธารณะสุขมากยิ่งขึ้นไป

บรรณานุกรม

จิตติ ท่าไว. 2547. **เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา**. วารสารวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Adam, A., Petil, J. F., & Wietzerbin-Falszpan, J. 1969. **L acid N-glycolyl-muramulque, contituant des Parois de *Mycobacterium smeg matis* identification par spectrometric de masse**. *FEBS Lett*. 4, 87-92.

Ahoronowitz, Y. 1980. **Nitrogen metabolite regulation of antibiotics biosynthesis**. *Ann. Rev. Microbiol,* 34, 209-233.

Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Bowden, G.H., & Hardie, J.M. 1977. **Fatty and mycolic composition of *Bacterionema matrucholii* and related organisms.** *J.* Gen. *Microbiol.* 98, 444-451.

A. Schatz, E. Bugie, W. Sa, 1944. **Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55. 1944, pp. 66-69.

Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E. and Lechevalier, H.A. 1964. **Rapid differentiation between *Norcadia* and *Streptomyces* by paper chromatography whole-cell hydrolysates**. *Appl. Microbiol.* 12, 421-423.

Berdy, J. 2005. **Bioactive microbial metabolites**. *J. Antibiot.* 58, pp 1-26.

Carlone, G.M., & Anet, F.A.L. 1983. **Detection of menaquinone-6 and novel methyl-suvtituted menaquinone-6 in *Camphylobacter jejuni* and *Compylobacter fetus* subsp. Fetus.** *J. Gen. Microbiol.* 128, 3385-3393.

Collins, M.D., & Langworthy. T.A. 1983. **Respiratory quinine composition of som acidophilic bacteria. Syst.** *Appl. Microbiol.* 4,295-304.

Collins, M.D., & F. Fernandez. 1984. **Menaquinone-6 and thermoplasmaquinone-6 in *Wolinella succinogenes*.** *FEMS Microbiol. Lett. 22*: 273-276.

Collins, M.D., & Langworthy, T.A. 1983. **Respiratory quinine composition of some acidophilic bacteria.** Syst. *Appl. Microbiol*. 4, 295-304.

Coyne, J. C. 1990. **Interpersonal processes in depression**. In G. I.Keitner (Ed.), *Depression and families.* pp. 31-54. Washington, DC: American Psychiatric Press.

Eftekharzadeh B1., Hamedi J., Mohammadipanah F., Khodagholi F., Maghsoudi N., & Klenk HP. 2010. **Inhibition of oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 May;86. 6:1805-11.

Goodfellow, M. & O'Donnell, A.G. 1993, **Roots of bacterial systematics, *in* "Handbook of new bacterial systematics"**. M. Goodfellw & A.G. O'Donnell. pp. 3-54. Academic Press, London, New York.

Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J. & Curtis, T. P. 1998. **Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity**. *Water Sci Technol* 37, 511–519.

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

Ishii, M., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., & Minoda, Y. 1983. **2-Methylthiol,4-naptoquinone, a new quinine from an extremely themorphilic hydrogen bacterium**. *Agric. Biol. Chem. 47, 167-169.*

Iwai. Y., & Omura, S. 1982. **Culture condition for sceening of new antibiotic.** *J. Antibiotics*. 35, 123-141.

Mia Y. Summers., Margaret Leighton., Danni Liu., Kevin Pong., & Edmund I. Graziani. 2006 **3-Normeridamycin: A Potent Non-Immunosuppressive Immunophilin Ligand is Neuroprotective in Dopaminergic Neurons.** *J. Antibiot*. 59. 3: 184–189, 2006

Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes**. *The Society for Actinomycetes Japan*. Japan.

Miyagawa, E., Azuma, R., & Suto. T. 1974. **Distribution of sphingolipid in bacteroides species**. *J. Gen. appl. Microbiol. 24,341-348*

Miyagawa, E., Anuma, R., Suto, T., &Yano, I. 1979. **Occurrence of free caramides in Bacteroidesfraglis**. *J. Biochem. 86, 311-320.*

Nonomura, H. 1989. Genus Streptosporangium Couch 1955, 148AL. In: S.T. Williams (ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Vol. 4, pp. 2545-2551

Nakajima, Y., Ktpreechavanich, V., Suzuki, K.I. ., & Kudo, T. 1999. *Microbispora coralline* sp. Nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int. J. Syst.. Bacteriol,* 49, 1761-1767

Okami Y, Hotta K . 1988. **Search and discovery of new antibiotics**, In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M . ed. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 33-67

Redfearn, E.R., & Powls, R. 1968. **The quinines of green photosynthetic bacteria**. *J. Biochem.* 106, 50.

Schleifer, K.H. and Kandler, O. 1972. **Peptidoglycan types of bacterial cell wall and their taxonomic implications**. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477

Seong-Hwan Kim., Hyeonseok Ko., Hea-Son Bang., Seon-Hui Park., Dong-Gyu Kim., Hak Cheol Kwon., et al. . 2011. **Coprismycins A and B, neuroprotective henylpyridines from the dung beetle-associated bacterium, *Streptomyces* sp.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21* . 2011. 5715–5718

Shaw, N. 1974. **Application of molecular Biological method in taxonomy of genus *Streptomyces*.** *Adv. Appl. Microbiol.* 17, 63—108

Tahara, Y., Yamada, Y., & Kondo. K. 1976b. **The ornithine and taurine-containing cerilipin. Agric.** *Bol. Chem.* 40, 1449-1450.

Shimi, I.R., Dewedar, A., & Abdallah, N, 1971. **Yemenimycin A new antibiotics.** *J. Antibiotics.* 24, 283-289.

Uchida, K., & Aida, K. 1977. **Acyl type of bacterial cell-wall its simple identification by colorimetric method**. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23, 249-260.

Uchida, K., & Aida, K. 1979. **Taxonomic significancenof cell-wall acyl type in *Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia*** group by a glycolate test. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 169-183.

Uchida, K., & Aida, K. 1984. **An improved method for the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacterial cell-well**. *J. Gen. Appl.Microbiol.* 30,131-134.

Weinberg, E.D. 1962. **Trace-metal control of specific biosynthetic process.** *Perspect. Biol. Med*. 5 432-445.

Yamada, Y., & Kondo, K. 1973. **Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Crytococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodosporidium*.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 19, 59-77.

Yamada, Y., & Arimoto, M. and Kondo, K. 1976. **Coenzyme Q system in the classification of apiculate yeasts in the genera *Nadsonia, Saccharomycoces, Hanseniaspora, Kloeckera,* and *Wickerhamia*.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 293-299.

Yamada, Y., Nojiri, M., Matsuyama, M., & Kondo, K. 1976. **Coenzyme Q system in the classification of the asscosporogenous yeast genera *Debaryomyces, Saccharomyces, Kluyveromyces,* and *Endomycopsis*.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 325-337.

[online]. Available : http :// emsb.qc.ca.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract – malt extract broth (ISP2)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal	20.0	กรัม
Tract salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salts – starch agar (ISP4)

Soluble starch	10.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	1.0	กรัม
$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
CaCO3	2.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glycerol – asparagine agar (ISP5)

L – asparagine (anhydrous)	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	1.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone – yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar	36	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม
L-asparagine (anhydrous)	1.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	0.5	กรัม
$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4{\cdot}7H_2O$	0.01	กรัม
Trace salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salts solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Glucose asparagines agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Czapek's sucrose agar (Difco)

Sucrose	30.0	กรัม
$NaNO_3$	2.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม

$MgSO_4$	0.5	กรัม
KCl	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (Difco)

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

ลักษณะการเจริญและสีของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* spp. บนอาหารต่างๆ

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

The NBS/IBCC Color System

The 267 Color Centroids

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
	Red, Pink		
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.5r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
	Yellowish Pink		
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	

28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85
	Reddish Orange, Reddish Brown	
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B55D43
40 Strong Reddish Brown	0.5yr 3.1 9.9	#7F180D
41 Deep Reddish Brown	1.0yr 1.5 8.5	#490005
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C
	Orange Brown	
48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923

59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B
	Orange Yellow, Yellowish Brown	
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.8 12.1	#D78E00
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86
74 Strong Yellowish Brown	8.3yr 4.6 8.5	#95590C
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 8.0	#593315
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F
	Yellow, Olive Brown	
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B

90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	
	Greenish Yellow, Olive		
97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359	
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910	
	Yellow Green, Olive Green		
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	

121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931
	Yellowish Green	
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.2 8.6	#8CCB5E
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712
	Green	
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830

152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513
	Bluish Green	
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
	Greenish Blue	
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.5	#2A8D9C
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027
	Blue	
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF

182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
	Purplish Blue		
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
	Violet		
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	

213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
	Purple		
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE94AB	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#8F706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.5rp 0.9 0.6	#1B1116	
	Reddish Purple		
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

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

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTC
GGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGAT
AAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGA
AAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGAC
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGA
AGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTGCG
TCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGC
TGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA
CCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGT
CTTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAA
TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACANTCNGAGANN
GATGCCTCCTTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGG
GGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGT
TGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC
AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCC
GTGGCCCAACCACTTGTGG

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAA
GTCGTAACAAGGTAGCCGTA

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

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGT
ACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGA
AACCGGGTCTAATACCGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTG
GGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
CTCGTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATAC
GGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA
GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTC
TTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACG
CGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGATGCCTCCTTTGGACTG
GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCG
GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAA
CATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGT
CTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAA
CACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATT

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGG

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATATGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAAGGTGGGGCTGGCGATT

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

TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTA
CTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAA
ACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGG
GATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
CGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGG
GCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTT
CCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACATTCAGAGACAGATCCCTCCTTTGGACTGGTG
TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGG
TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACAT
GCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACAC
CCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

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

GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCC
CTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATA
AGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTT
TTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCG
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGC
GGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTG
TGGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCG
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCT
TTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGA
GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGG
GCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
CAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA
GTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACC

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACATTCAGAGACAGATCCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGT

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGATGCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAA
GTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA

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

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACT
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC
CGGGTCTAATACCGGATACGACACTCCTCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGG
ATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGTGGCTTGTTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTC
CACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACTGGTGT
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATG
CTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACC
CGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGC

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

TGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTA
CTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAA
ACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGTGATGGTGGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGG
GATGGGCTCGCGGCCTATCAGATTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
CGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGG
GCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTT
CCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACATTCAGAGACAGATGCCTCCTTTGGACTGGTG
TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGG
TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACAT
GCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACAC
CCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGGCG