การแยกและระบุชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัด ราชบุรี

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM KUENG HOT SPRING AND CREEK AT RATCHABURI PROVINCE

พิพัฒน์ อิ่มรุ่งเรือง
เตชิต พลอยมีค่า
ภาวัต อารยะวุฒิ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การแยกและระบุชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัด ราชบุรี

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM KUENG HOT SPRRING AND CREEK AT RATCHABURI PROVINCE

พิพัฒน์ อิ่มรุ่งเรือง
เตชิต พลอยมีค่า
ภาวัต อารยะวุฒิ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM KUENG HOT SPRING AND CREEK AT RATCHABURI PROVINCE

PIPAT IMRUNGRUANG
TAECHIT PLOYMEEKHA
PHAWAT ARAYAWUT

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกและระบุชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัด ราชบุรี Isolation And Identification Of Actinomycetes Isolated From Kueng Hot Spring And Creek At Ratchaburi Province
ชื่อนักศึกษา	นายพิพัฒน์ อิ่มรุ่งเรือง รหัสนักศึกษา 55051352 นายเตชิต พลอยมีค่า รหัสนักศึกษา 55051356 นายภาวัต อารยะวุฒิ รหัสนักศึกษา 55051366
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกและระบุชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัด ราชบุรี
ชื่อนักศึกษา	นายพิพัฒน์ อิ่มรุ่งเรือง รหัสนักศึกษา 55051352
	นายเตชิต พลอยมีค่า รหัสนักศึกษา 55051356
	นายภาวัต อารยะวุฒิ รหัสนักศึกษา 55051366
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ .ดร.จิตติ ท่าไว

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 25 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดราชบุรี เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 13 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นเป็นสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora, Micromonospora* และ *Nocardia* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Microbispora hainanensis* มากที่สุดที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนช่วง 16S rRNA ที่ร้อยละ 98.5 แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานอื่นๆ ที่เป็นสมาชิกในสกุล *Microbispora* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 จึงมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Microbispora* จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในสิ่งแวดล้อมทางบริเวณดินบ่อน้ำพุร้อนของประเทศไทยมีค่อนข้างสูง และควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อไป

คำสำคัญ : ไมโครไบสปอรา ไมโครโมโนสปอรา นอคาร์เดีย แอคติโนมัยสีทหายาก แอคติโนมัยสีทที่ชอบอุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation And Identification Of Actinomycetes Isolated From Kueng Hot Spring And Creek At Ratchaburi Province
Student	Mr. PIPAT IMRUNGRUANG 55051352 Mr. TAECHIT PLOYMEEKHA 55051356 Mr. PHAWAT ARAYAWUT 55051366
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2015
Seminar Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

Abstract

Twenty five actimonycete strains were isolated from soil of hot spring area collected from Ratchaburi provinces, Thailand. These strains were grouped using phenotypic chemotypic and genotypic characteristics into 13 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Microbispora, Micromonospora* and *Nocardia*. Here, we found the strains RT1-7 and RT2-7 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genera *Microbispora* and were closely related to *Microbispora hainanensis* with 98.5% 16S rRNA gene sequence similarity value. These two strains was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Microbispora* species. Therefore, the strains RT1-7 and RT2-7 tended to be a novel species of the genus *Microbispora*. Based on these results, it could be concluded that actinomycete diversity in the hot spring environment is very great and should be represented an excellent source for the discovery of bioactive compounds.

Key words : *Microbispora, Micromonospora, Nocardia*, Rare actinomycetes, Thermophilic actinomycetes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษที่ได้รับหมอบหมายฉบับนี้เป็นการศึกษาค้นคว้างานวิจัยเรื่อง การแยกและระบุชนิดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัด ราชบุรี จนได้รายงานฉบับนี้ที่สำเร็จสมบูรณ์ได้ ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่านที่ได้กรุณาให้ค่าปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ได้แก่

บิดา มารดา ผู้ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนเกี่ยวกับการดำเนินงานต่างๆ

รศ.ดร.จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ให้ค่าปรึกษา คำแนะนำเกี่ยวกับคำศัพท์วิทยาศาสตร์การตรวจทาน และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่างๆ

ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และช่วยสอนเทคนิคต่างๆ

นางสาวนริศรา ก่ำแก้ว ที่ให้ค่าปรึกษา ให้ค่าแนะนำ ตลอดการศึกษาการทำโครงงานพิเศษ

นายประสิทธิ์ แผ้วบาง, นายวิทยา เขียวเขิน และนายสมัคร แสงจันทร์ ที่ให้ค่าแนะนำและการสนับสนุนอุปกรณ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการทดลองในการทำโครงงานพิเศษ

ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาส นี้

หากรายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้สนใจท่านใดก็ตามคณะผู้จัดทำขอยกความดีให้แก่ทุกท่านที่กล่าวขอบคุณมาข้างต้น และ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้

นาย พิพัฒน์ อิ่มรุ่งเรือง

นาย เตชิต พลอยมีค่า

นาย ภาวัต อารยะวุฒิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....ฉ

สารบัญรูป.....ช

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....3

2.2 การกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทในธรรมชาติ.....5

2.3 การจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....8

2.4 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท.....21

2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์(identification)ของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....30

2.6 ความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....47

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....57

3.1 เครื่องมือ.....57

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....58

3.3 การเก็บตัวอย่างและตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท.....58

3.4 การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท.....58

3.5 การเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยสีท.....59

3.6 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่มีความน่าสนใจ.....59

3.7 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....60

3.8 สถานที่ทำการทดลอง.....67

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....68

4.1 ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง.....69

4.2 การอภิปรายผล.....93

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....94

5.1 สรุปผลการวิจัย.....94

5.2 ข้อเสนอแนะ.....94

เอกสารอ้างอิง.....95

ภาคผนวก ก.....97

ภาคผนวก ข.....103

ภาคผนวก ค.....105

ภาคผนวก ง.....116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่าร้อยละของสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อที่อยู่รอดเมื่อแยกด้วยเทคนิคการใช้สารเคมี....24

2.2 วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน....28

2.3 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท....39

2.4 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมาก (major) ในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ....40

2.5 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วย กรดไดอะมิโนพิมิลิกแบบ meso....41

2.6 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย....42

2.7 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีท....43

2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก....53

3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส....65

3.2 วงจรพีซีอาร์....65

3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene....66

3.4 โปรแกรม Big_dye....67

4.1 การทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี....69

4.2การทดสอบความสามารถในการผลิตกรด....91

4.3 การทดสอบความสามารถในการใช้ฐานคาร์บอน....92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาส Actinobacteria โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene....8

2.2 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของเชื้อในอันดับ Actinomycetales 10

2.3 ลูไซท์ เพลท 25

2.4 การสร้างสปอร์เดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Micromonospora (A) สกุล Thermomonospora (B) และสกุล Saccharomonospora (C)....31

2.5 การสร้างสปอร์คู่ของ Microbispora (A) และสปอร์สายสั้นของ Nocardia brevicatena (B) และ Catellatospora (C) 32

2.6 ชนิดของสปอร์สายยาวแบบต่างๆ ที่สร้างโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Streptomyces (A) rectiflexibiles (B) retinaculiaperti (C) spira (D) verticillati 33

2.7 ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ที่สร้างบนเส้นใยอาหาร....34

2.8 ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ที่สร้างบนเส้นใยอากาศ....35

2.9 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน....38

2.10โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย.... 43

2.11 โครงสร้างของกรดมัยคอลิก 44

2.12 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตไจากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก....53

4.1 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-2....74

4.2 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-4.... 75

4.3 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-7....76

4.4 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-2....77

4.5 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-4....78

4.6 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-6....79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

4.7 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-7.....80

4.8 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-9.....81

4.9 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT3-1.....82

4.10 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT3-4.....83

4.11 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-1.....84

4.12 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-3.....85

4.13 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-4.....86

4.14 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT1-2 RT1-4 RT2-4 RT2-6 RT2-9 RT3-1 RT3-4 RT4-3 และ RT4-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method).....88

4.15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT2-2 และ RT4-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method.....89

4.16 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method.....90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย

เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างรากับแบคทีเรียคือมีขนาดและรูปร่างคล้ายแบคทีเรียแต่สร้างเส้นใยคล้ายรา สร้างสปอร์บนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหาร และเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร พบได้ทั่วไปในแหล่งต่างๆ เช่น ดิน น้ำ โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถนำมาผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารที่ใช้ในการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดิน ผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม ตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ในการเจริญได้ ใช้เป็นสารควบคุมศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตสารปฏิชีวนะ

ในสมัยปัจจุบันมีโรคชนิดใหม่เกิดขึ้นมามากมาย รวมไปถึงปัญหาจากโรคต่างๆที่เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นปัญหาต่อวงการอนามัยทั่วโลก จึงทำให้ทั่วโลกทำการศึกษาเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆอยู่เสมอ ซึ่งเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทมีบทบาทและมีความสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและรา โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทมีมากถึง 2 ใน 3 (มากกว่า 4,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่ค้นพบจากธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) แอนทราซัยคลิน (anthracyclines) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) เบต้า-แลคแทม (β-lactams) และ เตตราซัยคลิน (tetracyclines) เป็นต้น (Goodfellow และคณะ. 1988) และเนื่องจากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทจากสภาพแวดล้อมที่รุนแรงยังมีอยู่น้อย จึงทำให้ผู้ศึกษามีความสนใจที่จะศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากสภาพแวดล้อมที่รุนแรงว่ามีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะได้มากน้อยเพียงใด

เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่ดี มีดินที่อุดมสมบูรณ์ เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทจะเจริญอยู่มากและมีความหลากหลายของสายพันธุ์ โดยบ่อน้ำร้อนเป็นบ่อที่มีน้ำขังอยู่ตลอดเวลา มีอุณหภูมิที่สูง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต้องมีการปรับตัวเพื่ออยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งจะส่งผลให้มีโอกาสที่จะค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ผู้ศึกษามีความสนใจที่จะนำดินจากบ่อน้ำพุร้อนมาทำการคัดแยกเชื้อหาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการเจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงเหล่านี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาครั้งนี้จะเน้นไปที่การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินในบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี เพื่อทำการศึกษาอนุกรมวิธาน และการศึกษาเพื่อระบุสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงของเชื้อที่พบและมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่ถูกค้นพบได้ เพื่อนำไปศึกษาต่อถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี

1.2.2 เพื่อทำการระบุชนิดเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีท ที่แยกได้ด้วยทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างดินในสภาพธรรมชาติที่รุนแรงคือบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี ตลอดจนทำการแยกและคัดเลือกเชื้อเหล่านั้น จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมเพื่อดูลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และทำการแยก DNA และขยายปริมาณของยีน 16s rRNA เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบการระบุชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านั้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เก็บรวบรวมข้อมูลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

1.4.2 มีข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป

1.4.3 การศึกษาในครั้งนี้อาจพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการสร้างสารทุติยภูมิต่างๆ ที่น่าสนใจ และอาจจะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อทางด้านต่างๆ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์ สาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) มีปริมาณ เบสกวานีนและไซโตซีน (Mol% G+C) สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (มากกว่าร้อยละ 55) สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

เชื้อแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่คล้ายกบเชื้อราเนื่องจากมีการสร้างเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ แต่ก็มีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อรา คือ เซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจึงจัดเป็น สิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตต่างจากเซลล์ของเชื้อราที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัย สีทยังมีการสร้างเส้นใยที่มีขนาดเล็กกวาเส้นใยของเชื้อรา โดยเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1.0 ไมโครเมตร ในขณะที่เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ถึง 8 ไมโครเมตร (Coyne. 1999) เส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยสีทมักมีผนังกั้นและยืดยาวออกที่ส่วน ปลายของเส้นใย โครงสร้างภายในประกอบด้วยผนังเซลล์ซึ่งหนาประมาณ 10 ถึง 20 นาโนเมตร ถัดมามีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนของไซโทพลาซึม (cytoplasm) ที่ ประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) ไรโบโซม (ribosomes) และสารต่างๆที่สะสมภายในเซลล์ เช่น โพลีฟอสเฟต (polyphosphates) ไขมัน (lipids) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) นอกจากนี้ อาจมีมีโซโซม (mesosomes) ซึ่งจะเชื่อมต่อกบโครงสร้างของผนังเซลล์ (Vobis. 1997)

โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่จำเพาะและมีความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจากในสภาวะที่ถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เส้นใยมักเจริญอัดกันแน่นเป็นก้อนแข็งและมีบางส่วนฝังอยู่ในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสายพันธุ์ส่วนใหญ่มัก ปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่มีลักษณะเป็นฝุ่นผงแห้ง เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมักมีสีเฉพาะ ในแต่ละสายพันธุ์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) (Miyadoh. 1997) การสร้างโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทเริ่มด้วยการถ่ายชิ้นส่วนของเชื้อไม่ว่าจะเป็นสปอร์ เดี่ยว (single spore) สปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้ม (sporangium) หรือเส้นใยที่เกิดการแตกหักไปเลี้ยงบน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ชิ้นส่วนต่างๆ นี้จะเริ่มเจริญโดยการสร้างเส้นใยแทงลงไปใต้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) จากนั้นจะมีการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นสัมผัสกบอากาศเรียกว่า เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยทั่วไปเชื้อแอคติโนมัยสีทจะมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ แต่อาจพบเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสกุลมีการสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร ไม่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างเส้นใย อากาศ เช่น สกุล Micromonospora และ Actinoplanes หรือเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสกุลอาจพบเพียง การสร้างเส้นใยอากาศล้วนๆ เท่านั้น เช่น สกุล Sporichthya โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทอาจมี 5 ลักษณะนูน (raise) เรียบแบน (flat) บางครั้งอาจปกคลุมด้วยชั้นที่เหนียวคล้ายแผ่นหนัง (leather) โดยความเหนียวของโคโลนีอาจมีตั้งแต่ระดับที่อ่อนมากถึงเหลว ไปจนถึงโคโลนีที่แข็งมาก ส่วนสี ของโคโลนีมีตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาล และดำ ผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะ เรียบ (smooth) เป็นสันนูน (ridged) เหี่ยวย่น (wrinkled) เป็นตุ่ม (granular) หรือเป็นเกล็ด (squamous) โคโลนีอาจมีการเจริญโดยอัดกันแน่น หรืออาจมีการเจริญแบบเป็นวงกระจายออกจาก จุดศูนย์กลางในแนวรัศมี และมักมีสองวง ส่วนขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ และสภาวะในการเจริญ โดยโคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ระดับมิลลิเมตรไปจนถึงระดับ เซนติเมตร (Vobis. 1997)

เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ อาจสร้างเป็นสปอร์ เดี่ยว สปอร์คู่ หรือสร้างสปอร์ต่อกนเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกวา โคนิเดีย (conidia) อยู่บนเส้นใยอากาศ หรือบางสกุลอาจสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงซึ่งห่อหุ้ม สปอร์ไว้ เรียกวา สปอร์แรงเจียม (sporangium) (Coyne. 1999) เชื้อแอคติโนมัยสีทมักจะสร้างสปอร์ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญ เช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะงอกและขยายไปเป็นเส้นใย (Miyadoh. 1997) เชื้อแอคติโนมัยสีทไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) ส่วนใหญ่ ดำรงชีวิตแบบอิสระ (saprophyte) สามารถเจริญได้โดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีบางชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น Mycobacterium leprae ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อน และ Mycobacterium tuberculosis ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค บางชนิดก่อโรคในพืช เช่น Streptomyces scabies ซึ่งเป็น สาเหตุของโรคหูดของมันฝรั่ง (potato scab) และบางชนิดก่อโรคในสัตว์ แต่เชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดินส่วนใหญ่มักไม่เป็นอันตราย บางชนิด เช่น ในสกุล Frankia จะอาศัยอยู่ร่วมกบรากพืช และต้นไม้ใหญ่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Coyne. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทในธรรมชาติ

เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ทั่วไปในดิน โดยในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ 1 กรัม สามารถพบเชื้อแอคติโนมัยสีทได้มากถึง 1 ล้านเซลล์ เชื้อเหล่านี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยการย่อย สลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยในดิน (Miyadoh. 1997) ซึ่งส่วนมากจะพบในดินหรือตะกอน ดินที่มีสารอินทรีย์ เชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญได้ไม่ดีในดินเปียกเนื่องจากเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจน ในการเจริญ ไม่ทนทานต่อความแห้งแล้ง แต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อความแห้งแล้งได้ เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดี ซึ่งร้อยละ 95 ของเชื้อแอคติโนมัยสีท พบ ในดินที่มีสภาวะเป็นด่าง แต่ในทางตรงกนข้าม เชื้อแอคติโนมัยสีทจะไม่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกวา 5 ประชากรของเชื้อแอคติโนมัยสีทอาจลดลงเหลือเพียง ร้อยละ 1 (Coyne. 1999)

เนื่องจากดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของเชื้อแอคติโนมัยสีท ดังนั้นความหลากหลาย ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินจึงสูง ทำให้สามารถพบเชื้อเป็นจำนวนมากในหลายสกุลและหลาย สายพันธุ์ โดยพบได้ทั้งในดินที่ทำการเกษตรและดินที่ไม่ได้ทำการเกษตร ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และดินที่ไม่มีความอุดมสมบูรณ์ในภูมิภาคต่างๆ ทั่วทุกแห่งของโลก นอกจากจะพบเชื้อ แอคติโนมัยสีทในดินแล้วยังสามารถพบเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ในแหล่งอื่นๆ อีก เช่น ในแหล่งน้ำ ฝุ่นละออง บนพื้นผิวของพืช ในอาหาร และในระบบร่างกายของสัตว์ (Waksman. 1950)

Xu และคณะ (1996) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินจำนวน 4,200 ตัวอย่าง ซึ่ง เก็บจากพื้นที่ต่างๆ จำนวน 22 แห่งในมณฑลยูนาน ประเทศจีน ได้เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 29 สกุล ความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของเชื้อในพื้นที่ ที่มีสภาวะอากาศแตกต่างกันทั้งแบบเขตร้อน ที่ราบสูงกึ่งเขตร้อน เทือกเขาที่มีอุณหภูมิต่ำ และเทือกเขาที่มีหิมะปกคลุม โดยตัวอย่างดินใน เขตร้อน พบเชื้อสกุล Streptomyces ประมาณร้อยละ 86 ของจำนวนแอคติโนมัยสีททั้งหมด และพบ เชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก จำนวน 10 สกุล ได้แก่ *Actinomadura Actinoplanes Dactylosporangium Micromonospora Micropolyspora Nocardia Rhodococcus Saccharopolyspora Streptosporangium* และ *Thermoactinomyces* ตัวอยางดินในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนมีความหลากหลายของเชื้อแอคติ โนมัยสีทมากกว่าเขตเทือกเขาที่มีอุณหภูมิต่ำและเทือกเขาที่มีหิมะปกคลุม ตัวอย่างดินจากเทือกเขาที่มีอุณหภูมิต่ำและเทือกเขาที่มีหิมะปกคลุม จะ มีปริมาณของเชื้อสกุล Streptomyces สูงถึงร้อยละ 98 และยังพบวาดินในป่าสามารถพบเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ถึง 9 สกุล ซึ่งมีความหลากหลายของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยสีทมากกว่าดินในเขตที่ทำการเกษตรที่สามารถแยกเชื้อได้เพียง 6 สกุล ส่วนในบริเวณที่ แห้งแล้ง จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทจะลดลง เนื่องจากความอุดมสมบูรณ์ลดลง]

El-Shatoury และคณะ (2004) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทในระบบกราเวล เบด ไฮโดรโปนิกส์ (gravel bed hydroponics) ซึ่งเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำที่สร้างขึ้นสำหรับบำบัดน้ำเสียทาง อุตสาหกรรม สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากไบโอฟิล์ม (biofilm) ของระบบบำบัดได้จำนวน 102 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มีความหลากหลายทางอนุกรมวิธานสูง สามารถ จำแนกอยู่ในสกุล *Streptomyces Nocardioides Micromonospora Nocardiopsis Nocardia Actinomadura Pseudonocardia Planobispora Kineosporia และ Kitasatospora* ซึ่งเชื้อใน 4 สกุล หลังไม่เคยถูกแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมาก่อน โดยเชื้อที่พบได้มากที่สุด คือ เชื้อ สกุล *Streptomyces* และ *Nocardioides* เชื้อแอคติโนมัยสีทจากระบบกราเวล เบด ไฮโดรโปนิกส์นี้ เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลาย

Nakaew และคณะ (2009) แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 377 ไอโซเลต ได้จากตัวอย่างดินที่ เก็บจากถ้ำผาตูบและถ้ำผานางคอยในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าร้อยละ 55.44 เป็นเชื้อใน สกุล Streptomyces และร้อยละ 44.56 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากในสกุล *Actinocorallia Catellatospora Microbispora Micromonospora Nonomuraea Pseudonocardia Saccharothrix* และ *Spirillospora*

Hayakawa และคณะ (2010) ศึกษาการกระจายของเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินประเทศญี่ปุ่น เปรียบเทียบกันระหว่างดินในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ (cool-temperate area) โดยเก็บตัวอย่างดินจาก เกาะริชิริ (Rishiri) และดินในเขตอบอุ่น (subtropical area) จากเกาะอิริโอโมเตะ (Iriomote) แยกเชื้อqho โดยการเตรียมตัวอย่าง (pre-treatment) ด้วยวิธีการต่างๆ 5 วิธี แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารฮิวมิกแอซิด- วิตามิน เอการ์ (humic acid - vitamin agar) สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมดจำนวน 1,234 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากเกาะริชิริจำนวน 668 ไอโซเลต สามารถจัด จำแนกได้เป็น 17 วงศ์ 40 สกุล และ 178 สปีชีส์ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากเกาะอิริโอโม เตะจำนวน 566 ไอโซเลต ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้เป็น 21 วงศ์ 59 สกุล และ 194 สปีชีส์ จากการ วิเคราะห์พบวาการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินทั้งสองพื้นที่นี้ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามอนุกรมวิธานของเชื้อทั้งสองพื้นที่นี้มีความคาบ เกี่ยวกัน (overlap) เพียงเล็กน้อย โดยมีเชื้อเพียง 66 สปีชีส์เท่านั้นที่พบปรากฏอยู่ในทั้งสองพื้นที่

Thawai (2004) ทำการศึกษาเพื่อหาสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุจังหวัดตรัง พัทลุง ยะลา และนราธิวาส พบว่าสามารถแยกเชื้อที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยได้จำนวน 52 ไอโซเลต จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และทางอนุกรมวิธานเคมีรวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA จึงสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ได้เป็นแบคทีเรียในสกุลไมโครโมโนสปอรา พบว่าเชื้อที่แยกได้มี กรด meso-diaminopimelic ในผนังเซลล์ มีน้ำตาลไซโลส (xylose) และ อะราบิโนส (arabinose) และพบฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ชนิดฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นองค์ประกอบหลัก รวมทั้งมีกรดไขมันส่วนใหญ่แบบ iso-$C_{16:0}$ iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$ anteiso-$C_{16:0}$ anteiso-$C_{15:0}$ และ anteiso-$C_{17:0}$ และพบมีนาควิโนน (menaquinones) ชนิด MK9-(H4) MK9-(H6) หรือ MK10-(H4) นอกจากนี้พบวามีปริมาณ G+C ของสาย DNA อยู่ ในช่วง 71-73 mol% จากผลของความคล้ายคลึงทาง DNA และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี บางประการสามารถแบ่งแยกเชื้อเหล่านี้ได้เป็น 11 กลุ่ม และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อกลุ่มที่ 1 (8 สายพันธุ์) และกลุ่มที่ 3 (7 สายพันธุ์) เป็น M. chalcea และ M. aurantiaca ตามลำดับ สำหรับเชื้อ ไมโครโมโนสปอรา 9 กลุ่มที่เหลือแสดงผลของความคล้ายคลึงทาง DNA (12.9-53.1 %) และลำดับ เบสในช่วง 16S rDNA (97.5-99.2%) ในระดับต่ำรวมทั้งมีลักษณะทางฟีโนไทป์ แตกต่างไปจากเชื้อ ไมโครโมโนสปอราที่เคยมีรายงานไว้จึงสามารถจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ และได้เสนอชื่อสำหรับเชื้อ กลุ่ม ที่ 7 (2 สาย พันธุ์) และ กลุ่ม ที่ 11 (1 สาย พันธุ์) เป็น *Micromonospora eburnea* และ *Micromonospora aurantionigra* ตามลำดับ

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา และคณะ (2546) ทำการตรวจนับเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินจากป่า เบญจพรรณและป่าเต็งรัง บริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง พบวามีเชื้อสกุล Streptomyces จำนวน 41×10^4 ถึง 94.3×10^4 และ 52×10^4 ถึง 145.5×10^4 CFU ต่อดินหนึ่งกรัม ตามลำดับ และพบวามีเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก 17.6×10^4 ถึง 36×10^4 CFU และ 20.5×10^4 ถึง 42×10^4 CFU ต่อดินหนึ่งกรัม ตามลำดับ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวน 346 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกได้เป็น 11 สกุล คือ *Actinomadura Actinoplanes Microbispora Micromonospora Microtetraspora Nocardia Saccharomonospora Saccharopolyspora Streptomyces* และ *Streptosporangium*

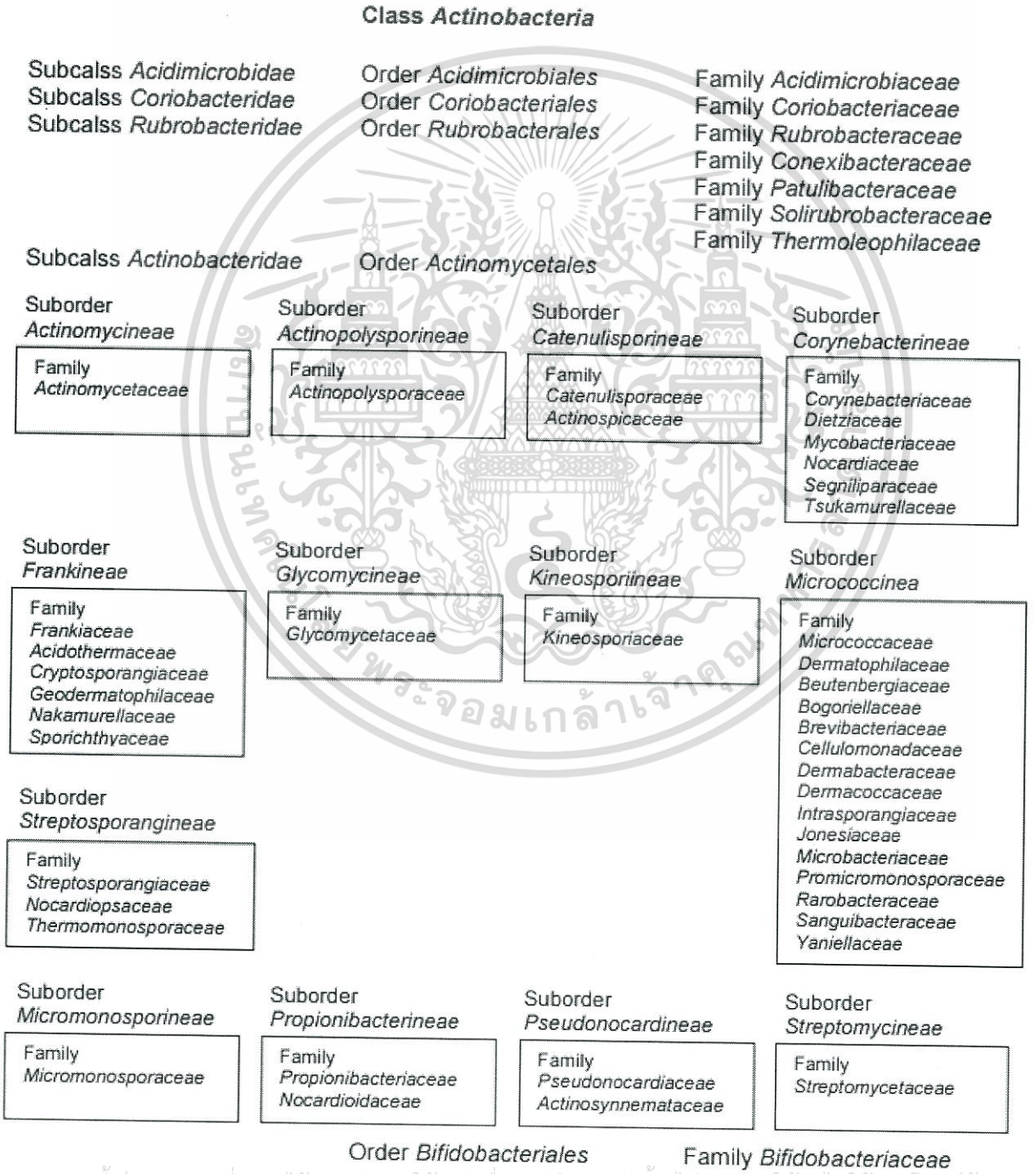
ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล และคณะ (2546) ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินใน พื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราชและสถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาจกกสิกิจ พบว่าดินในป่าเขตสงวน ชีวมณฑลสะแกราช มีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 63.7×10^6 ถึง 111×10^6 CFU ต่อกรัม และดินใน ไร่สุวรรณมีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 97.7×10^5 ถึง 110.7×10^5 CFU ต่อกรัม สามารถแยกเชื้อ แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลต จัดจำแนกได้ 14 สกุล คือ *Actinomadura Actinoplanes Amycolatopsis Catellatospora Dactylosporangium Herbidospora Microbispora Micromonospora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microtetraspora Nocardia Pseudonocardia Saccharomonospora Sacchropolyspora และ *Streptosporangium*

2.3 การจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

Zhi และคณะ (2009) ได้จัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาส (Class) Actinobacteria โดยศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene สามารถจำแนกได้เป็น 4 คลาสย่อย (subcalss) 5 อันดับ (order) 13 อันดับย่อย(suborder) และ50วงศ์ (family) ดัง แสดงในรูปที่2.1



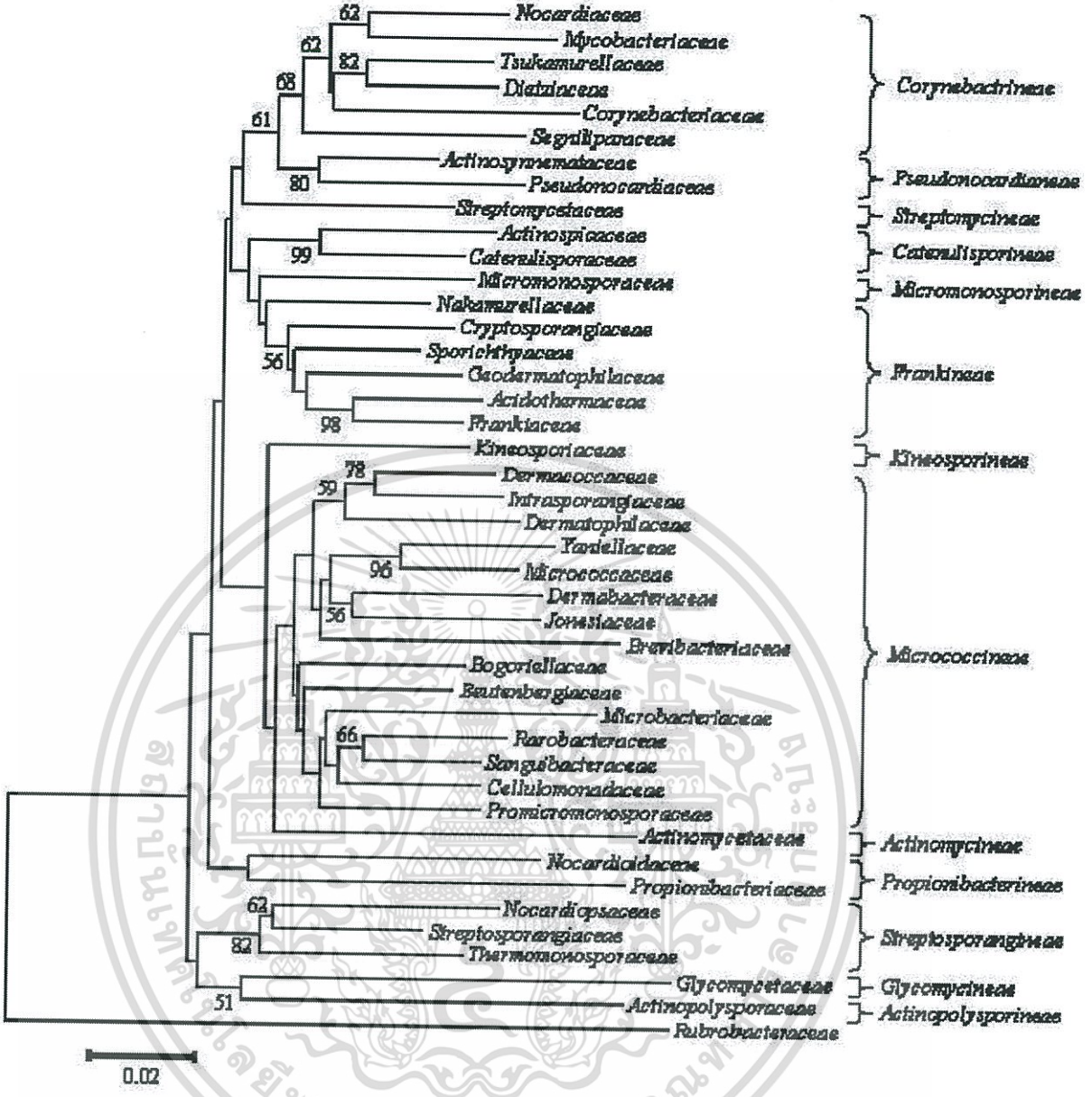
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาส *Actinobacteria* โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

แอคติโนแบคทีเรียในอันดับ *Actinomycetales* (รูปที่ 2.2) แบ่งเป็น 13 อันดับย่อย 42 วงศ์ (Zhi และคณะ. 2009) ดังนี้

1. อันดับย่อย Actinomycineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่ง127:234(R-U) 598:640(Y-G) 828(R) 829:857(G-C) 832:854(G-Y) 952:1229(C-G) และ 986:1219(A-U) มีสมาชิก 1 วงศ์ คือ *Actinomycetaceae* เชื้อในวงศ์นี้มี 7 สกุล ได้แก่ *Actinobaculum Actinomyces Arcanobacterium Falcivibrio Mobiluncus Trueperella* และ *Varibaculum* มีสกุล *Actinomyces* เป็นตัวแทนวงศ์(type genus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของเชื้อในอันดับ *Actinomycetales*

2. อันดับย่อย *ActInopolysporIneae* รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 242:284(C–G) 657:749(G–C) 672:734(C–G) 828(A) 829:857(G–C) 833:853(U–G) 840:846(C–G) 986:1219(U–A) 1100(U) 1183(C) 1117:1183(G–C) และ 1309:1328(G–U) มีสมาชิก 1 วงศ์คือ Actinopolysporaceae ประกอบด้วยเชื้อในสกุล Actinopolyspora

3. อันดับยอย่ Catenulisporineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 127:234(G–C) 209(G) 484(U) 828(U) 831:855(G–G) 840:846(U–G) 955:1225(C–G) 986:1219(U–A) และ 987:1218(G–C) มีสมาชิก 2 วงศ์ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 วงศ์ Actinospicaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยูตำแหน่งที่ 262(G) 344(G) 576(G) 747(U) 129:232(A–G) 580:761(C–G) 586:755(C–G) 658:748(A–U) 659:746(U–A) 824:876(C–G) 825:875(G–C) 834:852(G–C) 952:1229(C–G) 986:1219(A–U) และ 999:1041(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Actinospica

3.2 วงศ์ Catenulisporaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 262(A) 344(A) 576(A) 747(A) 129:232(U–A) 580:761(U–A) 658:748(U–U) 659:746(C–G) 824:876(A–U) 825:875(A–U) 834:852(G–G) 952:1229(U–A) 986:1219(U–A) และ 999:1041(U–U) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Catenulispora

4. อันดับย่อย Corynebacterineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(G–Y) 564(C) 672:734(U–G) 833:853(U–G) 952:1229(U–A) และ 986:1219(U–A) มีสมาชิก 6 วงศ์ได้แก่

4.1 วงศ์ Corynebacteriaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 250(U) 316:337(U–G) 418:425(C–G) 586:755(U–G) 599:639(C–G) 662:743(U–G) 987:1218(G–C) และ 1059:1198(U–A) ประกอบด้วยเชื้อ 4 สกุล ได้แก่ Bacterionema Caseobacter Corynebacterium และ Turicella มีสกุล Corynebacterium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

4.2 วงศ์ Dietziaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 241:285(U–G) 250(U) 316:337(C–G) 418:425(U–A) 599:639(C–G) 662:743(C–G) 987:1218(A–U) 1000:1040(A–U) 1059:1198(U–A) และ 1115:1185(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Dietzia

4.3 วงศ์ Mycobacteriaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 128:233(G–C) 250(U) 316:337(C–G) 418:425(C–G) 586:755(U–G) 599:639(U–G) 662:743(C–G) 987:1218(G–C) 1000:1040(A–U) และ 1026:1035(U–G) ประกอบด้วยเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ Amycolicicoccus และ Mycobacterium มีสกุล Mycobacterium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

4.4 วงศ์ Nocardiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 250(U) 316:337(C–G) 418:425(C–G) 580:761(U–A) 599:639(C–G) 662:743(C–G) 987:1218(G– 12 C) และ 1000:1040(A–U) ประกอบด้วยเชื้อ 8 สกุล ได้แก่ Gordonia Micropolyspora Millisia Nocardia Rhodococcus Skermania Smaragdicoccus และ Williamsia มีสกุล Nocardia เป็นตัวแทน วงศ์ (type genus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 วงศ์ Segniliparaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 128:233(G–C) 250(A) 316:337(C–G) 418:425(C–G) 586:755(C–G) 599:639(C–G) 662:743(C– G) 987:1218(G–C) 1000:1040(A–G) และ 1059:1198(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Segniliparus

4.6 วงศ์ Tsukamurellaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 128:233(G–C) 250(U) 316:337(C–G) 418:425(C–G) 580:761(C–G) 599:639(C–G) 987:1218(G–C) 1000:1040(A–C) และ 1059:1198(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Tsukamurella ใน อันดับย่อย Corynebacterineae นี้ พบว่ามีเชื้อจำนวน 2 สกุล ได้แก่ Hoyosella และ Tomitella ยังไม่ สามารถจำแนกได้ว่าเป็ นสมาชิกอยู่ ในวงศ์ใด (Jurado และคณะ. 2009 ; Katayama' และคณะ. 2010)

5. อันดับยอย่ Frankineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(G–C) 209(R) 828(A) 833:853(U–G) 840:846(C–G) 844(A) 845(C) 1163:1173(G–C) 1164:1172(G–U) และ 1165:1171(G–C) มีสมาชิก 6 วงศ์ ได้แก่

5.1 วงศ์ Acidothermaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่ง ที่ 184:193(C–U) 195(G) 196(C) 203:214(U–G) 589:650(U–A) 601:637(G–U) 602:636(A–U) 614:626(A–U) 841(U) 952:1229(U–A) 986:1219(U–A) 1059:1198(C–G) และ 1308:1329(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Acidothermus

5.2 วงศ์ Cryptosporangiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 195(U) 196(C) 601:637(A–U) 602:636(C–G) 841(U) 952:1229(C–G) 986:1219(A–U) 1042(U) 1059:1198(U–A) 1251(G) และ 1003:1037(A–C) ประกอบด้วยเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ Cryptosporangium และ Fodinicola มีสกุล Cryptosporangium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

5.3 วงศ์ Frankiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 184:193(A–C) 195(A) 196(U) 582:758(U–A) 601:637(G–U) 602:636(C–G) 841(C) 952:1229(U–A) 986:1219(A–U) 1059:1198(C–G) และ 1308:1329(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Frankia

5.4 วงศ์ Geodermatophilaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 157:164(A–U) 158:163(A–U) 184:193(A–C) 195(C) 196(A) 293:304(R–U) 601:637(G–U) 602:636(C–G) 841(A) 952:1229(U–A) 953:1228(U–A) 986:1219(U–A) 13 1059:1198(U–A) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1027:1034(C–G) ประกอบ ด้วยเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ Blastococcus Geodermatophilus และ Modestobacter มีสกุล Geodermatophilus เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

5.5 วงศ์ Nakamurellaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 184:193(A–C) 195(C) 196(A) 589:650(U–A) 601:637(A–U) 602:636(A–U) 670:736(U–A) 841(C) 952:1229(C–G) 955:1225(A–U) 986:1219(A–U) 1059:1198(U–A) 1120:1153(U–A) และ 1027:1034(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ Humicoccus Nakamurella และ Saxeibacter มี สกุล Nakamurella เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

5.6 วงศ์ Sporichthyaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 184:193(A–G) 195(C) 196(A) 416:427(G–C) 600:638(U–G) 601:637(G–U) 602:636(C–G) 612:628(U–A) 841(U) 952:1229(U–A) 986:1219(A–U) 1042(A) และ 1059:1198(U–A) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Sporichthya

6. อันดับยอย่ Glycomycineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 657:749(G–U) 672:734(C–G) 681:709(A–U) 831:855(U–G) 832:854(G–U) 833:853(G–C) 840:846(C–U) 952:1229(C–G) 1064:1192(G–G) และ 1117:1183(A–U) มีสมาชิก 1 วงศ์ คือ Glycomycetaceae ประกอบด้วยเชื้อ 3 สกุล ได้แก่ Glycomyces Haloglycomyces และ Stackebrandtia มีสกุล Glycomyces เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

7. อันดับย่อย Kineosporiineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 142:221(C–U) 598:640(U–G) 840:846(A–C) 845(A) 986:1218(A–U) 1163:1173(G–U) 1164:1172(G–C) และ 1165:1171(G–A) มีสมาชิก 1 วงศ์ คือ Kineosporiaceae ประกอบด้วยเชื้อ 5 สกุล ได้แก่ Angustibacter Kineococcus Kineosporia Pseudokineococcus และ Quadrisphaera มีสกุล Kineosporia เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8. อันดับย่อย Micrococcineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 598:640(U–G) 657:749(U–A) 953:1228(G–C) 986:1219(A–U) 987:1218(A–U) และ 1362(A) มีสมาชิก 15 วงศ์ ได้แก่

8.1 วงศ์ Beutenbergiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(G) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(U) ประกอบด้วยเชื้อ 4 สกุล ได้แก่ Beutenbergia Miniimonas Salana และ Serinibacter มีสกุล Beutenbergia เป็นตัวแทน วงศ์ (type genus)

8.2 วงศ์ Bogoriellaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(U) 342:347(U–G) 444:490(A–U) 580:761(C–A) 602:636(C–G) 14 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(A–U) 1361(G) และ 1383(U) ประกอบด้วยเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ Bogoriella และ Georgenia มีสกุล Bogoriella เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.3 วงศ์ Brevibacteriaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(A) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(U–A) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–U) 1109(C) 1145(A) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Brevibacterium

8.4 วงศ์ Cellulomonadaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(U) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–U) 1109(C) 1145(A) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(Y) ประกอบด้วยเชื้อ 5 สกุล ได้แก่ Actinotalea Cellulomonas Oerskovia Paraoerskovia และ Tropheryma มีสกุล Cellulomonas เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.5 วงศ์ Dermabacteraceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(U) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(U–A) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–G) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–U) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 4 สกุล ได้แก่ Brachybacterium Dermabacter Devriesea และ Helcobacillus มี สกุล Dermabacter เป็น ตัวแทนวงศ์ (type genus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.6 วงศ์ Dermacoccaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(C) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(U–A) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 7 สกุล ได้แก่ Branchiibius Calidifontibacter Demetria Dermacoccus Kytococcus Luteipulveratus และ Yimella มีสกุล Dermacoccus เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.7 วงศ์ Dermatophilaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(Y–K) 196(A) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(U–A) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 5 สกุล ได้แก่ Austwickia Dermatophilus Kineosphaera Mobilicoccus และ Piscicoccus มีสกุล Dermatophilus เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.8 วงศ์ Intrasporangiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(G) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(U–A) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(C) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 19 สกุล ได้แก่ Arsenicicoccus Fodinibacter Humibacillus Humihabitans Intrasporangium Janibacter Knoellia Kribbia Lapillicoccus Marihabitans Ornithinibacter Ornithinicoccus Ornithinimicrobium Oryzihumus Phycicoccus Serinicoccus Terrabacter Terracoccus และ Tetrasphaera มีสกุล Intrasporangium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.9 วงศ์ Jonesiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(C) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(U–C) 823:877(A–C) 826:874(U–G) 827(G) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Jonesia

8.10 วงศ์ Microbacteriaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(G–R) 196(U) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(R) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 35 สกุล ได้แก่ Agreia Agrococcus Agromyces Amnibacterium Aureobacterium Chryseoglobus Clavibacter Cryobacterium Curtobacterium Frigoribacterium Frondihabitans Glaciibacter Gulosibacter Herbiconiux Humibacter Klugiella Labedella Leifsonia Leucobacter Marisediminicola Microbacterium Microcella Microterricola Mycetocola Okibacterium Phycicola Plantibacter Pseudoclavibacter Rathayibacter Rhodoglobus Salinibacterium Schumannella Subtercola Yonghaparkia และ Zimmermannella มีสกุล Microbacterium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.11 วงศ์ Micrococcaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(W) 131:231(C–G) 196(C) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 13 สกุล ได้แก่ Acaricomes Arthrobacter Auritidibacter Citricoccus Kocuria Micrococcus Nesterenkonia Renibacterium Rothia Sinomonas Stomatococcus Yaniella และ Zhihengliuella มี สกุล Micrococcus เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus) 16

8.12 วงศ์ Promicromonosporaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(U) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(G–U) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 7 สกุล ได้แก่ Cellulosimicrobium Isoptericola Myceligenerans Promicromonospora Xylanibacterium Xylanimicrobium และ Xylanimonas มีสกุล Promicromonospora เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

8.13 วงศ์ Rarobacteraceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(A) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(G–U) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Rarobacter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.14 วงศ์ Sanguibacteraceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(C–G) 196(U) 342:347(C–G) 444:490(A–U) 580:761(C–G) 602:636(G–U) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(C) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Sanguibacter

8.15 วงศ์ Yaniellaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(U) 131:231(A–G) 196(C) 342:347(C–G) 444:490(U–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(G) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Yaniella ในเวลาต่อมา Yassin และคณะ (2011) ได้ปรับย้ายให้เชื้อสกุล Yaniella ซึ่งเป็น เชื้อสกุลเดียวของวงศ์นี้ไปเป็นสมาชิกอยู่ในวงศ์ Micrococcaceae ในอันดับย่อย Micrococcineae นี้พบว่ามีเชื้อจำนวน 2 สกุล ได้แก่ Koreibacter และ Luteimicrobium ยังไม่สามารถจำแนกได้วาเป็นสมาชิกของวงศ์ใด (Hamadaแ ล ะ ค ณ ะ . 2010;Leeแ ล ะ Lee.2010)

9. อันดับย่อย Micromonosporineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 209(G) 534(G) 831:855(U–G) 832:854(G–Y) 833:853(U–G) 840:846(Y–G) 845(G) 955:1225(A–U) 986:1219(U–A) และ 987:1218(G–C) มีสมาชิก 1 วงศ์ คือ Micromonosporaceae ประกอบด้วย เชื้อ 30 สกุล ได้แก่ Actinaurispora Actinocatenispora Actinoplanes Allocatelliglobosispora Amorphosporangium Ampullariella Asanoa Catellatospora Catelliglobosispora Catenuloplanes Couchioplanes Dactylosporangium Hamadaea Jishengella 17 Krasilnikovia Longispora Luedemannella Micromonospora Phytohabitans Pilimelia Planopolyspora Planosporangium Plantactinospora Polymorphospora Pseudosporangium Rugosimonospora Salinispora Spirilliplanes Verrucosispora และ Virgisporangium มีสกุล Micromonospora เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

10. อันดับย่อย Propionibacterineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 598:640(U–A) 657:749(G–C) 828(U) 829:851(A–C) 832:854(U–C) 833:853(G–U) 952:1229(C–G) และ 986:1219(U–A) มีสมาชิก 2 วงศ์ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.1 วงศ์ Nocardioidaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 328(C) 407:435(A–U) 451(G) 453(C) 819(U) 825:875(G–C) 827(U) 828(A) 832:854(G–G) 833:853 (U–C) และ 844(C) ประกอบด้วยเชื้อ 9 สกุล ได้แก่ Actinopolymorpha Aeromicrobium Hongia Flindersiella Kribbella Marmoricola Nocardioides Pimelobacter และ Thermasporomyces มีสกุล Nocardioides เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

10.2 วงศ์ Propionibacteriaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 328(U) 407:435(C–G) 451(A) 453(G) 819(G) 825:875(A–U) 827(C) 828(U) 832:854(U–C) 833:853(G–U) และ 844(U) ประกอบด้วยเชื้อ 16 สกุล ได้แก่ Aestuariimicrobium Arachnia Auraticoccus Brooklawnia Friedmanniella Granulicoccus Luteococcus Microlunatus Micropruina Propionibacterium Propionicicella Propioniciclava Propionicimonas Propioniferax Propionimicrobium และ Tessaracoccus มีสกุล Propionibacterium เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

11. อันดับย่อย Pseudonocardineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(G–C) 564(U) 672:734(U–G) 831:855(U–G) 832:854(G–Y) 833:853(U–G) 952:1229 (U–A) และ 986:1219(U–A) มีสมาชิก 2 วงศ์ ได้แก่

11.1 วงศ์ Actinosynnemataceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ อยู่ ตำแหน่งที่ 211(A) 480(G) และ 142:221(C–C) มีเชื้อสกุล Actinosynnema เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus) ในเวลาต่อมา Lebeda และคณะ (2011) ได้ปรับย้ายเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ในวงศ์นี้ ทั้งหมดให้ไปเป็นสมาชิกอยู่ในวงศ์ Pseudonocardiaceae

11.2 วงศ์ Pseudonocardiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 211(G) 480(U) และ 142:221(C–G) ประกอบด้วยเชื้อ 30 สกุล ได้แก่ Actinoalloteichus Actinobispora Actinokineospora Actinomycetospora Actinophytocola Actinosynnema Alloactinosynnema Allokutzneria Amycolata Amycolatopsis Crossiella Faenia Goodfellowiella Haloechinothrix Kibdelosporangium Kutzneria Lechevalieria Lentzea Prauserella Pseudoamycolata Pseudonocardia Saccharomonospora Saccharopolyspora Saccharothrix 18 Sciscionella Streptoalloteichus Thermobispora Thermocrispum Umezawaea และ Yuhushiella มีสกุล Pseudonocardia เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. อันดับยอย่ Streptomycineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(G–C) 449(A) 672:734(C–G) 950:1231(U–G) 952:1229(U–A) 955:1225(C– G) 965(C) 986:1219(A–U) และ 1362(C) มีสมาชิก 1วงศ์ คือ Streptomycetaceae ประกอบด้วยเชื้อ 10 สกุล ได้แก่ Actinopycnidium Actinosporangium Chainia Elytrosporangium Kitasatoa Kitasatospora Microellobosporia Streptacidiphilus Streptomyces และ Streptoverticillium มีสกุล Streptomyces เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

13. อันดับย่อย Streptosporangineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(A–U) 829:857(G–C) 830:856(G–C) 953:1228(U–A) 950:1231(U–A) 955:1225(C–G) 986:1219(A–U) และ 987:1218(A–U) มีสมาชิก 3 วงศ์ ได้แก่

13.1 วงศ์ Nocardiopsaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 440:497(U–U) 485(G) 501:544(G–C) 502:543(A–U) 833:853(U–G) และ 1355:1367(G–C) ประกอบด้วยเชื้อ 6 สกุล ได้แก่ Haloactinospora Marinactinospora Murinocardiopsis Nocardiopsis Streptomonospora และ Thermobifida มีสกุล Nocardiopsis เป็น ตัวแทนวงศ์ (type genus)

13.2 วงศ์ Streptosporangiaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 440:497(C–G) 485(U) 501:544(C–G) 502:543(G–C) 833:853(U–G) และ 1355:1367(A–U) ประกอบด้วยเชื้อ 11 สกุล ได้แก่ Acrocarpospora Herbidospora Microbispora Microtetraspora Nonomuraea Planobispora Planomonospora Planotetraspora Sphaerisporangium Streptosporangium และ Thermopolyspora มีสกุล Streptosporangium เป็น ตัวแทนวงศ์ (type genus)

13.3 วงศ์ Thermomonosporaceae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 440:497(C–G) 501:544(C–G) 502:543(G–C) 831:855(G–G) 843(U) 844(A) และ 1355:1367(A–U) ประกอบด้วยเชื้อ 6 สกุล ได้แก่ Actinoallomurus Actinocorallia Actinomadura Excellospora Spirillospora และ Thermomonospora มีสกุล Thermomonospora เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus)

ในอันดับย่อย Streptosporangineae นี้พบวามีเชื้อในสกุล Sinosporangium ยังไม่สามารถ จำแนกได้ว่าเป็นสมาชิกของวงศ์ใด (Zhang และคณะ. 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ในเวลาต่อมาได้มีการพบเชื้อแอคติโนมัยสีทเพิ่มขึ้นจากเดิม ซึ่งในบางสกุลเป็นเชื้อ แอคติโนมัยสีทที่มีความสัมพันธ์แตกต่างจากกลุ่มที่มีอยู่เดิมในระดับวงศ์หรือในระดับอันดับย่อย ทำให้อันดับ Actinomycetales มีจำนวนสมาชิกเพิ่มขึ้นจากที่ Zhi และคณะ (2009) ได้เสนอไว้ ทั้งใน ระดับวงศ์และในระดับอันดับย่อย ดังนี้

1. อันดับย่อย Jiangellineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 127:234(G–C) 598:640(C–G) 672:734(G–C) 831:855(U–A) 833:853(G–C) 840:846(A–U) 950:1231(G–C) 952:1229(G–C) 955:1225(G–U) 986:1219(U–G) และ 987:1218(C–G) มีสมาชิก 1 วงศ์ คือ Jiangellaceae ประกอบด้วยเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ Jiangella และ Haloactinopolyspora มี สกุล Jiangella เป็นสกุลมาตรฐาน (Tang และคณะ. 2011)

2. วงศ์ Demequinaceae เป็นสมาชิกใหม่ในอันดับย่อย Micrococcineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120 (A) 131:231(C–G) 196(A) 342:347(C–G) 444:490 (A–U) 580:761(C–G) 602:636(C–G) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874 (C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(C) ประกอบด้วยเชื้อ 1 สกุล คือ Demequina (Ue และคณะ. 2011)

3. วงศ์ Ruaniaceae เป็นสมาชิกใหม่ในอันดับย่อย Micrococcineae รูปแบบของ 16S rRNA gene signatures nucleotides อยู่ ตำแหน่งที่ 120(A) 131:231(A–G) 196(C) 342:347(C–G) 444:490 (C–U) 580:761(C–G) 602:636(S–K) 670:736(A–U) 822:878(G–C) 823:877(G–C) 826:874(C–G) 827(U) 843(U) 950:1231(U–A) 1047:1210(G–C) 1109(C) 1145(G) 1309:1328(G–C) 1361(G) และ 1383(U) ประกอบด้วยเชื้อ 2 สกุล ได้แก่ Haloactinobacterium และ Ruania มีสกุล Ruania เป็นตัวแทนวงศ์ (type genus) (Tang และคณะ. 2010)

<u>หมายเหตุ</u>

A คือ อะดีนีน (adenine)

C คือ ไซโตซีน (cytosine)

G คือ กวานีน (guanine)

U คือ ยูราซิล (uracil)

K คือ คีโต (keto) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเป็น G หรือ U

R คือ เพียวรีน (purine) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเป็น G หรือ A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ผู้ใดนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

W คือ วีค บอนด์ (weak bonds) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเป็น A หรือ U

Y คือ ไพริมิดีน (pyrimidine) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจเป็น U หรือ C

2.4 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ทั่วไปในดิน ในดินนอกจากจะมีเชื้อแอคติโนมัยสีทแล้ว ยังมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกหลายชนิดอาศัยอยู่ เช่น แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ทำให้เกิดความสมดุลของระบบนิเวศ ด้วยเหตุที่ในดินมีสิ่งมีชีวิตอยู่หลายชนิด ดังนั้นการคัดแยก เชื้อแอคติโนมัยสีทจึงจำเป็นต้องทำการกำจัดเชื้อชนิดอื่นก่อน โดยอาศัยลักษณะพิเศษของเชื้อ แอคติโนมัยสีทที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตทั่วไป คือ สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อ ความร้อน และทนต่อสารเคมีได้ (Miyadoh. 1997) ในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดิน เชื้อ แอคติโนมัยสีทสกุล Streptomyces พบได้เป็นจำนวนมากที่สุด เนื่องจากเชื้อสกุลนี้เจริญเติบโตง่าย และรวดเร็ว ทำให้เกิดการแย่งและบดบังการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลอื่นๆ ดังนั้น จำเป็นต้องมีการนำเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น เทคนิคการเพิ่ม จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการในตัวอย่างดิน (enrichment) หรือเทคนิคการเตรียมดินตัวอย่าง (pretreatment) เพื่อลดจำนวนหรือขจัดเชื้อในสกุล Streptomyces และเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ ต้องการ (Hayakawa. 2008) การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมีเทคนิคในการคัดแยกหลายวิธี ได้แก่

2.4.1การใช้แบคเทอริโอเฟจ(bacteriophage)(Kurtboke.2003)

เฟจ (phage) ถูกใช้ในการกาจัดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการ ทำให้สามารถแยกเชื้อ กลุ่มเป้าหมายได้ โดยเฟจมีความไวต่อแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ขัดขวางการเจริญของเชื้อ แอคติโนมัยสีทหายาก การใช้แบคเทอริโอเฟจในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากอาจใช้เฟจที่มี ความจำเพาะกับแบคทีเรียมากกว่า 1 สปีชีส์เรียกว่า โพลีวาเลนท์เฟจ (polyvalent phages) เพื่อลดจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการบนจานอาหาร ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้มีการตรวจพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากและเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ได้ ตัวอย่างเช่น การใช้แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ Bacillus (Bacillus phages) และการใช้แบคเทอริโอเฟจของเชื้อ Streptomyces (Streptomyces phages) เป็นต้น จากการเจือจางตัวอยางที่ต้องการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากด้วย สารละลายโพลีวาเลนท์เฟจความเข้มข้นต่างๆ แทนการใช้น้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ แล้วปล่อยทิ้งไว้เป็น เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้เพาะลงบนอาหารที่ใช้แยกเชื้อ พบวาสามารถลดจำนวนเชื้อที่ ไม่ต้องการได้ โดยเมื่อใช้สารละลายโพลีวาเลนท์เฟจที่ความเข้มข้น $10^{10\text{-}12}$ pfu ต่อมิลลิลิตรจะลด จำนวนเชื้อที่ไม่ต้องการได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment techniques) (Hayakawa. 2003)

เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างวิธีต่างๆ ร่วมกับ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และมีการเติมสารปฏิชีวนะลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การเพิ่ม โอกาสเพื่อทำให้สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้ดีขึ้นมักทำโดยใช้กลยุทธ ดังนี้

2.4.2.1 การขจัดเชื้อสกุล Streptomyces และจุลินทรีย์ชนิดอื่น เป็นการขจัดหรือลดปริมาณจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ รวมทั้งเชื้อสกุล Streptomyces ซึ่งจัดเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบได้ทั่วไปและมีอยู่ เป็นจำนวนมากในดิน โดยจะใช้คุณสมบัติที่แตกต่างกันของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสกุล การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) มีหลายวิธี ได้แก่

(1) การใช้ความร้อนแห้ง (dry heating) การให้ความร้อนแห้งแก่ตัวอย่างดินแห้งที่อุณหภูมิ 100 หรือ 120 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยและเชื้อสกุล Streptomyces ได้ ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทหายากในบางสกุล เช่น Microbispora และ Streptosporangium ยังคงมี ชีวิตรอดอยู่ได้ โดยผลลัพธ์ของวิธีนี้สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้หลายสกุล เช่น Actinomadura Kutzneria Microbispora Microtetraspora Nonomuraea Saccharomonospora Streptosporangium และ Thermobifida

(2) การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ (chemical germicides) ความทนทานต่อสารเคมีของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดต่างๆ สามารถใช้เป็นกลยุทธในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้อย่างจำเพาะ (specific rare actinomycetes) ความทนทานของสปอร์ต่อสารเคมีฆ่าเชื้อ เช่น สารละลายฟีนอล (phenol) ความ เข้มข้นร้อยละ 1.5 สารละลายคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนต (chlorhexidine gluconate) ความเข้มข้นร้อย ละ 0.01 และสารละลายเบนซีโทเนียมคลอไรด์ (benzethonium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01สามารถใช้เป็นวิธีในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้ซึ่งสรุปได้ดังตารางที่2.1

(3) การใช้การปั่นเหวี่ยงด้วยแรงที่แตกต่าง(differential centrifugation) เชื้อแอคติโนมัยสีทบางกลุ่มสร้างซูโอสปอร์ (zoospore) ที่สามารถเคลื่อนที่ ได้โดยใช้แฟลกเจลลา เช่น Actinoplanes Dactylosporangium Actinokineospora Actinosynnema และ Kineosporia เป็นต้น การปั่นเหวี่ยงสามารถนำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่ออกจากเชื้อสกุล Streptomyces และเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลอื่นที่ไม่เคลื่อนที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.2 การเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก (enrichment of rare actinomycete populations)

(1) การเพิ่มจำนวนก่อนการบ่ม (prior incubation of the substrate) เป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากในตัวอยางที่ต้องการแยกก่อน เพาะลงบนจานอาหาร ซึ่งอาจทำโดยการบ่มตัวอย่างดินโดยตรงลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเฉพาะ เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น Microbispora และ Microtetraspora การเตรียม ตัวอย่างดินด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) ในสภาวะควบคุมสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อ Actinokineospora spp. ได้ดี หรือการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซอยเอ็กแทรกท์ (phosphate buffer-soil extract) สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างซูโอสปอร์ เช่น Actinokineospora Actinosynnema Catenuloplanes Cryptosporangium Dactylosporangium Geodermatophilus Kineosporia และ Sporichthya ได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ค่าร้อยละของสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อที่อยู่รอดเมื่อแยกด้วยเทคนิคการใช้สารเคมี (Hayakawa. 2003)

Genus	structure	survival %[a]		
		1.5% phenol	0.01% BC	0.01% CG
Actinomycetes				
Micromonosporaceae				
Actinoplanes (2)[b]	Sporangiospores	0	0	0
Dactylosporangium (2)	Aleuriospores	0	51	0
	Sporangiospores	0	0	0
Micromonospora (5)	Aleuriospores	76	1	5
Nocardiaceae				
Nocardia (1)	Athrospores	0	0	2
Pseudonocardiaceae				
Saccharomonospora (1)	Aleuriospores	0	0	0
Streptomycetaceae				
Streptomyces (8)	Athrospores	1	0	2
Streptosporangiaceae				
Microbispora (2)	Athrospores	53	70	63
Microtetraspora (3)	Athrospores	1	70	81
Nonomuraea (2)	Athrospores	1	4	17
Streptosporangium (5)	Sporangiospores	12	26	22
Thermomonosporaceae				
Actinomadura (3)	Athrospores	57	0	14
Other bacteria				
Gram-positive rods				
Bacillus (1)	Endospores	91	63	82
	Vegetative cells	0	0	0
Gram-negative aerobes				
Pseudomonas (2)	Vegetative cells	0	0	0

[a] หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

BC คือ benzethonium chloride CG คือ chlorhexidine gluconate

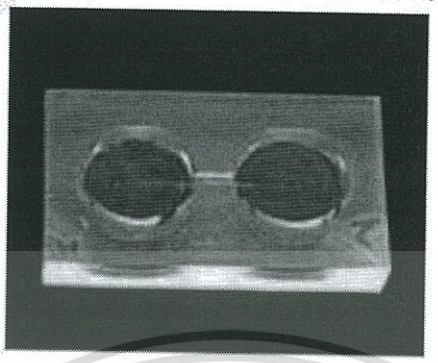
[b] จำนวนสปีชีส์ที่ทำการทดสอบ

(2) การใช้สารเคมีเป็นตัวดึงดูด(chemotaxis)

เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยใช้หลักของการเคลื่อนที่เข้าหาหรือหนีห่างจากสารเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักใช้อุปกรณ์ พิเศษที่เรียกว่า ลูไซท์ เพลท (Lucite plate) (รูปที่ 2.3) ซึ่งมีความหนา 9 มิลลิเมตร และมีหลุม (well)รูปทรงกระบอก 2 หลุม หลุมหนึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 มิลลิเมตร ส่วนอีกหลุมหนึ่งมีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 32 มิลลิเมตร หลุมทั้งสองจะเชื่อมต่อกันด้วยช่อง (channel) ขนาดกว้าง 2 มิลลิเมตร และลึก 3 มิลลิเมตร นำดินตัวอย่างที่ผึ่งให้แห้งแล้วน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมบัฟเฟอร์ที่ เป็นตัวดึงดูด (chemotaxis buffer) ซึ่งมีส่วนผสมของสารที่มีผลดึงดูดให้เชื้อแอคติโนมัยสีทเคลื่อนที่ เข้าหา (attractants) เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(KCl) คอลลิดีน (collidine) และวานิลลิน (vanillin) ลงในหลอดแกวแคปิลลารี (glass capillary tube) ขนาด 1 ไมโครลิตร แล้ววางลงในช่อง (channel) เพื่อเก็บซูโอสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่เข้าหา จากนั้นนำสปอร์ที่อยู่ในหลอดแก้ว แคปิลลารีมาเจือจาง แล้วเพาะลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 2.3 ลูไซท์ เพลท (Hayakawa. 2008)

(3) การใช้เหยื่อล่อ(baiting)

เทคนิคการใช้ละอองเกสรดอกไม้เป็นเหยื่อล่อ (pollen-baiting technique) เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการแยกราน้ำซึ่งนักวิทยาศาสตร์หลายท่านใช้สำหรับแยกเชื้อ Actinoplanes spp. แม้ว่าเหยื่อต่างๆ เช่น ละอองเกสรดอกไม้ (pollen) หนังงู (snake skin) ใบหญ้า (grass leaves) และขนสัตว์เลี?ยงลูกด้วยนม สามารถใช้ดึงดูดซูโอสปอร์ของ Actinoplanes ได้ แต่ เหยื่อที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ละอองเกสร (pollen grains) ของสน (Pinus) เนื่องจากอยู่ในถุงหุ้มและสามารถลอยน้ำได้ตลอด ทำให้ซูโอสปอร์ของเชื้อว่ายเข้ามายึดติดและมีอากาศเพียงพอต่อการเจริญ

2.4.2.3 การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดเลือก(selective nutrient media)

โดยทั่วไปแล้วเชื้อแอคติโนมัยสีทมีข้อเสียเปรียบจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ ในแหล่งธรรมชาติเดียวกันเมื่อเจริญร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเจริญได้ช้ากว่า ดังนั้น อาหารที่ใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจึงต้องออกแบบให้มีผลขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ คู่แข่ง และไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท อาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากต้องเป็นอาหารที่ไม่อุดมสมบูรณ์ เนื่องจากอาหารที่อุดมสมบูรณ์ จะทำให้Streptomyces และแบคทีเรียอื่นเจริญได้ดีมาก เป็นผลให้พบจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้น้อยลง เชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก เช่น Microbispora และ Streptosporangium ต้องการสารอาหารในปริมาณน้อยสำหรับการสร้างสปอร์ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท เช่น อาร์จินิน วิตามิน เอการ์ (arginine vitamin agar) และฮิวมิกแอซิด-วิตามิน เอการ์ (humic acid-vitamin agar) ที่มีการเติมสารละลายวิตามินลงไปด้วย เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีท หายากหลายชนิดต้องการวิตามิน-บี เพื่อใช้ในการเจริญ อาหารฮิวมิกแอซิด-วิตามิน เอการ์ (humic acid-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vitamins agar) ประกอบด้วยกรดฮิวมิก (humic acids) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ แบคทีเรียในดินทั่วไปไม่สามารถใช้ได้ บนอาหารนี้สามารถพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากหลาย ชนิดเจริญได้ เช่น Microbispora Micromonospora และ Streptosporangium ในขณะที่จำกัดการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่สร้างเส้นใย นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทหายากที่เจริญบนอาหารชนิดนี้ จะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการจำแนกเชื้อเบื้องต้นทางสัณฐาน วิทยาได้

2.4.2.4 การใช้สารปฏิชีวนะ

การเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารที่ใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถเพิ่ม โอกาสในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ สารปฏิชีวนะที่ใช้มักเป็นสารลดการปนเปื้อนของเชื้อรา เช่น ไซโคลเฮกซิไมด์(cycloheximide) นิสเตติน (nystatin) และไพมาริซิน (pimaricin) เป็นต้น สำหรับการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย มักนิยมใช้สารปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกัน เช่น การ ใช้เพนนิซิน-จี (penicillin G) ร่วมกบโพลีมิกซิน-บี (polymyxin B) ในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดิน และการใช้ไตรเมโทพริม (trimethoprim) ร่วมกบกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) เป็นต้น นอกจากนี้สารปฏิชีวนะยังสามารถใช้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากเฉพาะกลุ่มได้ เช่น การใช้ ทูนิคามัยซิน (tunicamycin) สำหรับแยกเชื้อสกุล Micromonospora การใช้ลิวโคมัยซิน (leucomycin) สำหรับแยกเชื้อสกุล Streptosporangium เป็นต้น การใช้สารปฏิชีวนะชนิดที่แตกต่าง ร่วมกันสามารถใช้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เฉพาะในระดับสกุลหรือระดับสปีชีส์ได้เช่นการใช้กานามัยซิน (kanamycin) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ Microtetraspora spp. การใช้ฟราดิโอมัยซิน (fradiomycin) กานามัยซิน (kanamycin) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) และไตรเมโทพริม (trimethoprim) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ Actinokineospora spp. และการใช้กานามัยซิน (kanamycin) โจซามัยซิน (josamycin) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) และไลโซไซม์ (lysozyme) ร่วมกันสำหรับคัดแยกเชื้อ Actinomadura viridis เป็นต้น

2.4.3 การใช้คลื่นไมโครเวฟ(microwaves)และการให้กระแสไฟฟ้าเป็นระยะ(electricpulses) (Terekhova.2003)

2.4.3.1 การใช้รังสีความถี่ยิงยวด(superhigh frequency radiation,SHF)

รังสีความถี่ยิ่งยวดหรือไมโครเวฟ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อได้ทั้งแบบสเตอริไลเซชัน (sterilization) และพาสเจอไรเซชัน (pasteurization) ผลของไมโครเวฟที่มีต่อ แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดไม่ทนความร้อนนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการฉายรังสีและความเข้มข้นของจุลินทรีย์เริ่มต้นจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์สามารถทนต่อไมโครเวฟได้มากกว่าจุลินทรีย์ที่ม่สร้างสปอร์ ดังนั้น จึงสามารถนำไมโครเวฟมาใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ โดยแผ่รังสี ไมโครเวฟลงใน สารละลายดินตัวอย่าง ซึ่งใช้ความถี่และกำลังไฟฟ้าในอัตราต่างๆ แล้วค่อยนำสารละลายดินตัวอย่างนั้นมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมหรือไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะ

2.4.3.2 การให้กระแสไฟฟ้าเป็นระยะ (electric pulses) การให้กระแสไฟฟ้าสลับเป็นช่วงๆ สามารถใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีผลทำให้เกิดอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) ต่อตัวเซลล์แบคทีเรีย หลักการนี้สามารถนำมา ประยุกต์ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้เช่นเดียวกัน โดยการนำตัวอย่างสารละลายดินมาผ่านกระแสไฟฟ้าเป็นระยะๆ จากการทดลองพบวาสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมีความ ทนทานต่อกระแสไฟฟ้าได้ดีกวาสปอร์ของเชื้อสกุล Streptomyces ดังนั้นวิธีนี้จึงทำให้สามารถเพิ่มอัตราการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้มากขึ้น และสามารถลดอัตราการพบเชื้อในสกุล Streptomyces ให้น้อยลงได้

2.4.3.3 การใช้รังสีความถี่สูงสุด (extreme high frequency radiation, EHF)

รังสีความถี่สูงสุดสามารถใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำรังสีความถี่สูงสุดมาใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนต่อรังสีชนิดนี้ได้ ซึ่งได้มีการศึกษา การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก โดยการใช้รังสีความถี่สูงสุดแผ่ลงบนสารละลายดินตัวอย่างที่ ความยาวคลื่นต่างๆ พบวาสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆได้ดีทำให้เพิ่มโอกาสในการค้นพบเชื?อแอคติโนมัยสีทหายากได้มากขึ้น

2.4.4 ตัวอย่างการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) หลายวิธีร่วมกัน สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากเฉพาะสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตัวอย่าง วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก แสดงดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน (Hayakawa. 2003)

Pretreatment	Media[a]	Genera selected	References
Physical: Dry heat at 120°C for 1 h	AV agar, MC agar, MGA-SE agar or salts-starch agar with cycloheximide, nystatin, polymixin B and penicillin	*Actinomadura, Kutzneria, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Saccharomonospora, Streptosporangium* and *Thermobifida*	Nonomura และ Ohara. 1969 a, b, 1971 a, b, c, d, 1974
Physical and enrichment: Dry heat at 120°C (or 100°C) for 1 h and cultivation on agar	AV agar, GAC agar, MGA-SE agar or soil-extract agar with cycloheximide, nystatin, polymixin B and penicillin	*Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora* and *Streptosporangium*	Nonomura และOhara. 1960 a,b, 1969 a, 1971 a, b
Chemical: Phenol 1.5%	HV agar with nalidixic acid and tunicamycin	*Micromonospora*	Hayakawa และคณะ. 1991a
Chloramine-T	HV agar	*Herbidospora, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea* and *Streptosporangium*	Hayakawa และคณะ. 1997
Physical and chemical: Dry heat at 110°C for 1 h and phenol 1.0%	HV agar with kanamycin, josamycin, lysozyme and nalidixic acid	*Actinomadura viridis*	Hayakawa และคณะ. 1995a
Dry heat at 120°C for 1 h and phenol 1.5%-CG 0.01%	HV agar with nalidixic acid	*Microbispora*	Hayakawa และคณะ. 1991a
Dry heat at 120°C for 1 h and BC 0.01% (or 0.03%)	HV agar with nalidixic acid and leucomycin (or tunicamycin)	*Streptosporangium* or *Dactylosporangium*	Hayakawa และคณะ. 1991b
Dry heat at 110°C for 1 h and BC 0.05%	LSV-SE agar with kanamycin, nalidixic acid and norfloxacin	*Microtetraspora*	Hayakawa และคณะ. 1996
Enrichment: Chemotaxis (γ-collidine, vanillin)	HV agar with nalidixic acid	*Actinoplanes, Catenuloplanes, Dactylosporangium* and *Virgosporangium*	Hayakawa และคณะ. 1991c, 1995b
Enrichment and physical: Pollen-baiting and drying	HV agar with nalidixic acid	*Actinoplanes*	Hayakawa และคณะ. 1991d
Rehydration (30°C, 90 min) and centrifugation (1,500×g, 20 min)	HV agar with nalidixic acid and trimethoprim	*Actinoplanes, Actinokineospora, Actinosynnema, Catenuloplanes, Cryptosporangium, Dactylosporangium, Geodermatophilus, Kineosporia* and *Sporichthya*	Hayakawa และคณะ. 2000
$CaCo_3$, rehydration and centrifugation	HV agar with fradiomycin, kanamycin, nalidixic acid and trimethoprim	*Actinokineospora*	Otogura และคณะ. 2001

[a] ทั้ง HV agar และ LSV-SE agar มีส่วนผสมของสารยับยั้งเชื้อราไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide)

Hayakawa และ Nonomura (1989) ได้คิดวิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินโดยนำตัวอย่าง ดินมาผสมกับสารละลายซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 6 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecly sulfate, SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารฮิวมิกแอซิด-วิตามิน เอการ์ (humic acid-vitamins agar) ที่เติมสารปฏิชีวนะ คือ กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะกระตุ้นการงอกของสปอร์ การแยก เชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยวิธีนี้ สามารถเพิ่มปริมาณการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ร้อยละ 40 และลด ปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 20 ซึ่งจำนวนแบคทีเรียจะลดลงเหลือน้อยกวาร้อยละ 10 เมื่อมีการเติมกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ลงไปในอาหารที่ใช้แยกเชื้อ

Suzuki และคณะ (1999) แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Sporichthya ได้โดยนำตัวอย่างดินที่ผึ่ง จนแห้งแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน สารละลายซึ่งประกอบด้วยหางนม (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในสารละลายกรดมอร์โฟ-ลีนโพรเพนซัลโฟนิก (morpholinepropanesulfonic acid, MOPS) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วิธีนี้สามารถ กระตุ้นให้สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ เคลื่อนที่ออกมาอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารฮิวมิกแอซิด-วิตามิน-เจลแลนกม (humic acid - vitamin - gellan gum medium, HVG)

Hayakawa และคณะ (2000) คิดค้นวิธีการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยวิธีรีไฮเดรชันและ การปั่นเหวี่ยง (rehydration and centrifugation) เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ ที่เคลื่อนที่ได้ โดยทำการแช่ดินตัวอย่างที่ผึ่งจนแห้งแล้วลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซอยเอ็กแทรกท์ (phosphate buffer-soil extract) ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากดิน (soil extract) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500×g เป็น เวลา 20 นาที ดูดส่วนใสซึ่งมีสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่ได้ (zoospore) เพาะลงบนจาน อาหารฮิวมิก แอซิด-วิตามิน เอการ์ (humic acid - vitamin agar) ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ คือ กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) และไตรเมโทพริม (trimetophim) การแยกเชื้อด้วยวิธีนี้ สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซอยเอ็กแทรกท์ (phosphate buffer - soil extract) จะช่วยให้สปอร์สามารถเคลื่อนที่ออกมาในส่วนใสได้อย่างอิสระ และการปั่นเหวี่ยงจะกำจัดเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Streptomyces และเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดอื่นที่ไม่เคลื่อนที่ออกจากส่วนใส จึงทำให้ง่ายต่อการ คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เคลื่อนที่ได้ วิธีนี้สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ที่ สามารถเคลื่อนที่ได้จากตัวอย่างดินต่างๆ ได้ร้อยละ 36 ถึงร้อยละ 86

Suzuki และคณะ (2001) แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Planomonospora ได้โดยนำตัวอย่างดินที่ผึ่งจนแห้งแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากเย็นแล้วนำไปแช่ใน สารละลายซึ่งประกอบด้วยหางนม (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในสารละลายกรดเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-อะมิโน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีเทนซัลโฟนิก (N-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid, CHES) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 90 นาที เพื่อกระตุ้นให้สปอร์เคลื่อนที่ออกมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มอีกครั้งเป็นเวลา 60 นาที ดูดส่วนใสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารฮิวมิกแอซิด-เทรกซอลต์ เจลแลนกัม (humic acid - trace salts gellan gum medium) ซึ่ง เติมสารปฏิชีวนะ คือ ไตรเมโทพริม (trimetrophim) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) อีนอกซาซิน (enoxacin) โซเดียม-แอมพิซิลลิน (sodium-ampicillin) ไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) และนิสเตติน (nystatin)

Hamaki และคณะ (2005) พบเชื้อแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร ซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ได้ใช้กันโดยทั่วไป อาหารชนิดนี้ ประกอบด้วยสารสกัดจากดิน (soil extract) 500 มิลลิลิตรต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 15 กรัมต่อลิตร และ ไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมสารสกัดจากดิน (soil extract) ทำโดยใช้ดิน 1 กิโลกรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร บ่มไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง นำไปกรอง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที นำส่วนใสมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เมื่อเชื้อเจริญทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยการตรวจดูโคโลนีภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ ได้เชื้อแอคติโนมัยสีท 6 สายพันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการศึกษาสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าเชื้อที่แยกได้มีแนวโน้มเป็น เชื้อแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ในสกุล Actinomadura จำนวน 2 สายพันธุ์ สกุล Streptosporangium จำนวน 1 สายพันธุ์ และสกุล Acrocarpospora จำนวน 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ พิสูจน์ เอกลักษณ์ได้เป็น Microbacterium cookie และ Frankia sp.

2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์(identification)ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วน (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) เคโมไทป์ (chemotype) และจีโนไทป์ (genotype) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.5.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

เป็นลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏให้เห็น เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีดังนี้คือ

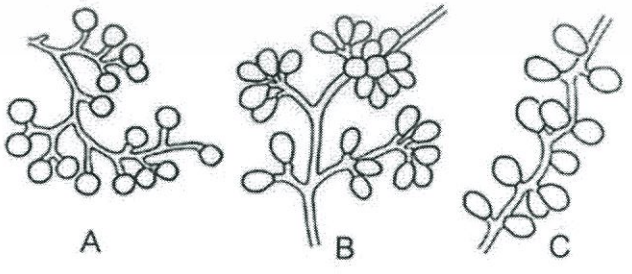
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ทำโดยการศึกษาลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างของเชื้อแอคติโนมัยสีท เช่น ลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร และลักษณะสปอร์ ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยใช้กล้อง จุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) เป็นเลนส์วัตถุ หรือในกรณีที่ต้องการรายละเอียดที่ชัดเจนมากขึ้นอาจศึกษาโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.5.1.1.1 ลักษณะเส้นใย ลักษณะของเส้นใยสามารถบ่งบอกลักษณะของเชื้อในแต่ละสกุลได้ โดยเส้นใยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เส้นใยที่เจริญแทรกลงไปใต้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร และเส้นใยที่ชูขึ้นมาบนอากาศ เรียกวา เส้นใยอากาศ โดยปกติเชื้อแอคติโนมัยสีทจะสร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีเชื้อแอคติโนมัยสีทในบางสกุลสร้างแค่เส้นใยอาหารเท่านั้น เชื้อแอคติโนมัยสีทมีการ สร้างเส้นใยที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น บางสกุลอาจสร้างเส้นใยที่มีการหักเป็นท่อนๆบางสกุลสร้างเส้นใยที่แตกเป็นกิ่งก้านเป็นต้น

2.5.1.1.2 ลักษณะสปอร์สปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีทั้งสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) และ สปอร์ที่มีถุงหุ้ม (sporangiospore) การเรียงตัวของสปอร์สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้โดยเชื้อแอคติโนมัยสีทมักมีการสร้างสปอร์แบ่งออกเป็น3ลักษณะ(Vobis.1997)ดังนี้

(1) สปอร์เดี่ยว (single spore หรือ monosporous) มักพบได้ทั่วไปในเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสกุล เช่น สกุล Micromonospora มีการสร้าง สปอร์บนเส้นใยอาหาร สปอร์มีทั้งแบบไม่มีกานชูสปอร์หรือมีก้านชูสปอร์สั้น และแบบอยู่ร่วมกัน เป็นช่อ การสร้างสปอร์เริ่มจากการโป่งพองของปลายเส้นใยลงมาจนถึงผนังกันแล้วค่อยมีการสร้าง ผนังสปอร์ เชื้อสกุล Thermomonospora สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ ปลายกานชูสปอร์จะมีทั้ง แบบที่มีการแตกแขนง และแบบที่ไม่มีการแตกแขนง เชื้อสกุล Saccharomonospora มีการสร้าง สปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่อยู่บนปลายก้านชูสปอร์ที่สั้น และก้านชู สปอร์ไม่มีการแตกแขนง ตัวอย่างการสร้างสปอร์เดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ แสดงดัง รูปที่ 2.4



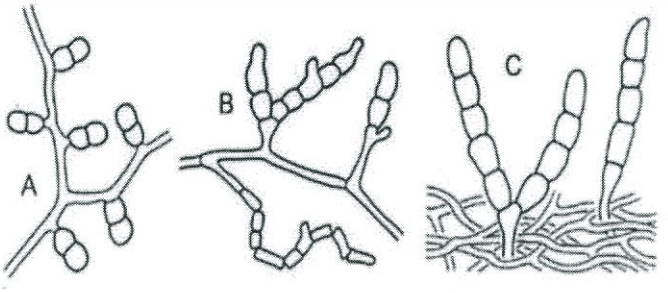
รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์เดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Micromonospora (A) สกุล Thermomonospora (B) และสกุล Saccharomonospora (C) (Vobis. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) สปอร์ที่สร้างต่อกันเป็นสาย (spores formed in chains) สปอร์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เกิดจากการสร้างผนังกั้นเส้นใยในแต่ละห้องทำให้เส้นใย เปลี่ยนไปเป็นสปอร์ เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีการสร้างสปอร์ในลักษณะนี้ การเรียกชนิดของ สปอร์จะเรียกตามลักษณะของสปอร์ ความยาวของสายสปอร์ และจำนวนสปอร์ เช่น สปอร์คู่ (disporous)สปอร์สายสั้น(oligosporous)และสปอร์สายยาว(polysporous)

สปอร์คู่ เป็นคู่ของสปอร์ที่มีการเรียงตัวตามยาว สปอร์มีลักษณะกลมไปจนถึงรูปไข่ มีเส้น ผ่านศูนย์กลาง 2 ไมโครเมตร ผนังสปอร์มีความหนามากกว่าเส้นใย 3 ถึง 4 เท่า ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นมากอยู่บนเส้นใยอากาศ การสร้างสปอร์ในช่วงแรกเกิดจากการแยกตัวออกทางด้านข้างของเส้น ใยอากาศทำให้เกิดเป็นแขนงสั้นๆ และเกิดการโป่งพองพร้อมกบสร้างผนังกั้นตรงกลางตามแนวขวางเชื้อที่มีลักษณะการเรียงตัวของสปอร์แบบนี้ เช่น สกุล Microbispora (รูปที่2.5)

สปอร์สายสั้น เป็นการสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายสั้นๆ ส่วนมากในแต่ละสายจะมีสปอร์ ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ น้อยที่สุด 3 สปอร์ หรือบางสายพันธุ์สร้างได้มากถึง 30 สปอร์ ตัวอย่างเช่น เชื้อ Nocardia brevicatena (รูปที่ 2.5) มีการสร้างสปอร์สายสั้นจำนวน 2 ถึง 7 สปอร์อยู่บนเส้นใย อาหารและเส้นใยอากาศ โดยก้านชูสปอร์และสายสปอร์อาจเกิดมาจากเส้นใยที่มีการแตกหักเป็น ท่อนๆ เชื้อ Saccharopolyspora rectivirgura มีการสร้างสายสปอร์ที่มักมีสปอร์จำนวนน้อยกว่า 5 สปอร์อยู่ที่ด้านข้างหรือส่วนปลายของเส้นใยที่ไม่มีการแตกกิ่งก้าน เชื้อสกุล Actinomadura และ Microtetraspora มีการสร้างสปอร์สายสั้นที่มีลักษณะเฉพาะอยู่บนเส้นใยอากาศ จำนวนสปอร์ต่อ สายนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ โดยสกุล Microtetraspora มีสปอร์จำนวน 4 สปอร์ต่อสาย ส่วนสกุล Actinomadura มีสปอร์จำนวน 10 ถึง 20 สปอร์ต่อสาย สายของสปอร์อาจมีลักษณะตรงโค้งงอเป็นรูปตะขอ หรือมีลักษณะเป็นเกลียว ในบางสายพันธุ์ เช่น Actinomadura pusilla สายของสปอร์มีลักษณะขดกันเป็นก้อนหนาซึ่งมีลักษณะคล้ายกับถุงหุ้มสปอร์ของ เชื้อสกุล Streptosporangium เรียกสปอร์ลักษณะนี้ว่าซูโดสปอแรงเจีย (pseudosporangia) เชื้อสกุล Catellatospora (รูปที่ 2.5) สร้างสายสปอร์ที่มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ มีสปอร์จำนวน 5 ถึง 30 สปอร์ ซึ่งโผล่ออกมาโดยตรงจากอาหารบนก้านชูสปอร์ที่สั้น ก้านชูสปอร์อาจมีการแตกแขนง หรือไม่มีการแตกแขนงก็ได้



รูปที่ 2.5 การสร้างสปอร์คู่ของ Microbispora (A) และสปอร์สายสั้นของ Nocardia brevicatena (B) และ Catellatospora (C) (Vobis. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์สายยาว ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์สายยาว คือ สกุล Streptomyces มี การสร้างสายสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์มากกวา 50 สปอร์ มักเรียกสปอร์ที่เป็นสายยาวนี้ว่า อาร์โทรสปอร์ (arthrospore) ลักษณะของสายสปอร์ที่แตกต่างกันสามารถใช้ในการจัดกลุ่มให้เป็นมาตรฐาน ได้ การสร้างสปอร์ของเชื้อสกุล Streptomyces สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด (รูปที่ 2.6) คือ

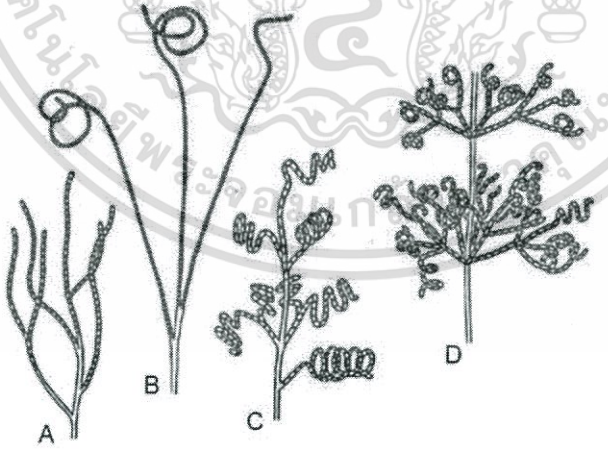
ก.rectiflexibilesสายของสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ

ข.retinaculiapertiสายของสปอร์มีลักษณะคล้ายรูปตะขอหรือหมุนเป็นเกลียว1-3รอบ

ค.spira สายของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบ คือ เกลียวแบบวงปิดติด กันแน่น และเกลียวแบบวงเปิดไม่ติดกันแน่นมีลักษณะยาวและยืดออกไป

ง. verticillati สายของสปอร์ขดเป็นก้นหอย และแตกแขนงออกเป็นช่อ

นอกจากเชื้อสกุลStreptomycesแล้วยังมีสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยสีทในวงศ์ Pseudonocardiaceae อีกจำนวนมากที่มีการสร้างสปอร์สายยาว เช่น เชื้อสกุล Pseudonocardia สร้างสายสปอร์ที่เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ซึ่งสายสปอร์มักจะเป็นรูปซิกแซก (zigzag) เชื้อ สกุล Actinopolyspora สร้างสปอร์สายยาวอยู่บนเส้นใยอากาศ เชื้อสกุล Kibdelosporangium สร้าง สปอร์สายยาวและมีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงหุ้มสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ รวมทั้ง เส้นใยมีการแตกหักเป็นท่อน

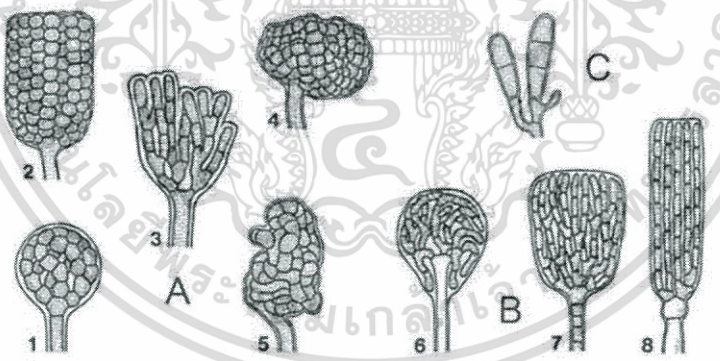


รูปที่ 2.6 ชนิดของสปอร์สายยาวแบบต่างๆ ที่สร้างโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล Streptomyces (A) rectiflexibiles (B) retinaculiaperti (C) spira (D) verticillati (Vobis. 1997)

(3) สปอร์ที่สร้างอยูภายในถุงหุ้ม (spores formed within sporangia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสกุลสร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้ม โดยถุงหุ้มสปอร์จะสร้างขึ้นมา ห่อหุ้มสปอร์ตั้งแต่เริ่มมีการสร้างสปอร์ไปจนกระทังสปอร์แก่จึงมีการปล่อยสปอร์ออกมาจากถุง หุ้ม ถุงหุ้มสปอร์มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและรูปร่าง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2 ถึง 50 ไมโครเมตร แต่ส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร มีรูปร่างต่างๆ เช่น รูป ทรงกระบอก (cylindrical) รูปกระบอง (clavate) รูปทรงคล้ายท่อ (tubular) รูปขวด (bottle-shaped) รูประฆัง (campanulate) รูปนิ้วมือ (digitate) รูปร่างที่ไม่เป็นทรง (irregular) รูปแฉก (lobate) รูปร่าง คล้ายร่ม (umbellifrom) รูปผลแพร์ (pyriform) หรือรูปทรงกลม (globose) เราสามารถจำแนกชนิด ของสปอร์ที่สร้างอยู่ภายในถุงหุ้มได้โดยการสังเกตจำนวนสปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์การเรียกชื่อสปอร์ในกรณีที่มีสปอร์จำนวนน้อยอยู่ภายในถุงหุ้ม เช่น มี 1 สปอร์ เรียก โมโนสปอรัส (monosporous) มี 2 สปอร์ เรียก ไดสปอรัส (disporous) แต่ในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมากอยู่ภายในถุงหุ้ม เรียก โพลีสปอรัส (polysporous) โครงสร้างภายในของสปอร์แบบโพลีสปอรัสนี้ สปอร์อาจ อยู่ชิดกันเป็นวง หรือเรียงตัวขนานกันเป็นแถวอยู่ภายในถุงหุ้ม ซึ่งถุงหุ้มสปอร์นี้จะเชื่อมกับผนังชั้นนอกของกานชูสปอร์ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้มนี้มีทั้งสกุลที่สร้างสปอร์ อยู่บนเส้นใยอาหาร เช่น Actinoplanes Ampullariella Dactylosporangium และ Pilimelia (รูปที่ 2.7) และสกุลที่สร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ เช่น Planomonospora Planobispora Planotetraspora Planopolyspora Spirillospora และ Streptosporangium (รูปที่ 2.8)



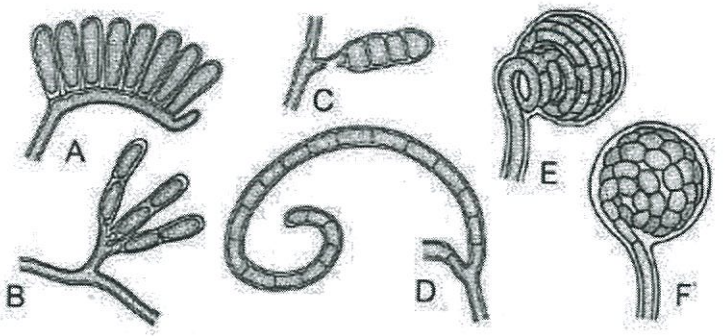
รูปที่ 2.7 ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ที่สร้างบนเส้นใยอาหาร (Vobis. 1997)

(A)ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อสกุล Actinoplanes รวมทั้งสกุล Ampullariella 1.ทรงกลม 2.ทรงกระบอก 3.รูปแฉก 4.กึ่งทรงกลม 5.รูปร่างที่ไม่เป็นทรง

(B)ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อสกุลPilimelia 6.รูปไข่7.รูประฆัง8.ทรงกระบอก

(C)ถุงหุ้มสปอร์รูปกระบองของเชื้อสกุล Dactylosporangium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ถุงหุ้มสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ที่สร้างบนเส้นใยอากาศ (Vobis. 1997)
(A)ถุงหุ้มสปอร์แบบโมโนสปอรัสของเชื้อสกุลPlanomonosporaสปอร์รูปทรงกระบอก
(B)ถุงหุ้มสปอร์แบบไดสปอรัสของเชื้อสกุลPlanobisporaสปอร์รูปทรงกระบอก
(C)ถุงหุ้มสปอร์แบบเตตระสปอรัสของเชื้อสกุลPlanotetrasporaสปอร์รูปทรงกระบอก
(D)ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอรัสของเชื้อสกุลPlanopolysporaสปอร์รูปทรงคล้ายท่อ
(E)ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอรัสของเชื้อสกุลSpirillosporaสปอร์รูปทรงกลม
(F) ถุงหุ้มสปอร์แบบโพลีสปอรัสของเชื้อสกุล Streptosporangium สปอร์รูปทรงกลม

2.5.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (cultural characteristic) เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดสามารถเจริญได้โดยใช้สารประกอบที่มีโครงสร้างง่ายๆ ในทางตรงกันข้ามบางชนิดจะเจริญได้ต้องใช้ สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนเท่านั้น นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทอาจจะสามารถปรับตัวให้ สามารถใช้สารอาหารที่มีอยู่ได้ ปริมาณการสร้างเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหารที่หาได้ และปริมาณการใช้สารอาหารนั้นๆ (Waksman. 1950) สามารถทำการศึกษา ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารที่เพาะเลี้ยงได้ โดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท ลงบนอาหารต่างๆ แล้วสังเกตลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหารสีของเส้นใยอากาศรวมทั้งการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ

2.5.1.3ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.5.1.3.1 คุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization) ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยสีทอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีสารอาหารหลาย ชนิด พวกมันสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่มากมายและหลากหลายเป็นแหล่งคาร์บอนและ แหล่งพลังงาน เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการใช้สารเป็นแหล่งคาร์บอนต่างกัน ซึ่ง ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนนี้มักนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ (Waksman.1950)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.3.2 คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) แป้งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลแพคติน (amylopectin) เมื่อต้มแป้งอะไมโลสจะละลายแต่ อะไมโลแพคตินจะไม่ละลาย ทั้งอะไมโลสและอะไมโลแพคตินมีองค์ประกอบ คือ น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ในอะไมโลสน้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิก (1,4-α-glucosidic) ส่วนอะไมโลเพคตินมีทั้งพันธะ 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิก และพันธะ 1,6-แอลฟา- กลูโคซิดิก (1,6-α–glucosidic) จุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งเป็นอาหารได้จะต้องมีเอนไซม์ภายนอก (exoenzyme) เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ซึ่งสามารถย่อยแป้งและไกลโคเจน (glycogen) โดยตัดที่พันธะ 1,4-แอลฟา-กลูโคซิดิก (ดวงพร คันธโชติ. 2537) การทดสอบการย่อยแป้งจึงเป็นการ ตรวจคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในแบคทีเรีย โดยใช้สารละลายไอโอดีนเทให้ท่วมผิว อาหาร ถ้ามีการย่อยแป้ง จะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากแป้งบริเวณนั้นถูกย่อย หมดไป ส่วนที่ยังมีแป้งเหลืออยู่อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน(สุราษฎร์กุฏอินทร์และคณะ.2538)

2.5.1.3.3 คุณสมบัติในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) เจลาตินเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียที่ย่อยเจลาตินได้ต้องมี การสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (galatinase) เพื่อย่อยเจลาตินให้มีโมเลกุลเล็กลง เมื่อเจลาตินถูกย่อยจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจล ทำให้มีลักษณะเป็นของเหลวถึงแม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ(ดวงพร คันธโชติ. 2537) โดยคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อแอคติโนมัยสีทในลักษณะ นี้ถูกนำไปใช้สำหรับการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ได้(Waksman.1950)

2.5.1.3.4 คุณสมบัติในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction) เชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (NO_{3-}) ให้เป็ นไนโตรต์ (NO_{2-}) ความสามารถของเชื?อแอคติโนมัยสีทในการรีดิวซ์ไนเตรตนี้สามารถ นำมาใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ได้ (Waksman. 1950) โดยกระบวนการรีดิวซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนเตรตให้เกิดเป็นไนไตรต์ และแอมโมเนีย (NH_3) เรียกว่าไนเตรตรีดักชั่น (nitrate reduction) การสลายตัวของไนเตรตเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเหลวที่มีโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) เราสามารถทดสอบไนไตรต์ที่เกิดขึ้นโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ก่อนและตามด้วย แอลฟา-แนฟทิลลามีน (α-naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิกและไนไตรต์จะได้ เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salt : diazonium sulfanilic acid) ซึ่งจะรวมตัวกับแอลฟา-แนฟทิลลามีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye) (ดวงพร คันธโชติ. 2537)

2.5.1.3.5คุณสมบัติในการย่อยโปรตีนในนม

ในหางนมจะมีอาหารที่แบคทีเรียใช้ประโยชน์ได้ เช่น น้ำตาลแลกโตส (lactose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และโปรตีนคาซีอิน (casein) แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถใช้อาหารดังกล่าว แตกต่างกัน (สุราษฎร์ กุฎอินทร์ และคณะ. 2538) แบคทีเรียบางชนิดสร้างเอนไซม์คาซีอินเนส (caseinase) ย่อยสลายโปรตีนคาซีอินซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้น้ำนมเป็นสีขาวด้วยขบวนการเปปโตไน เซชัน (peptonization) ทำให้เนื้อน้ำนมมีลักษณะเหลวและใสขึ้น เรียกว่าเวย์ (whey) อาจพบตะกอนละเอียดอยู่ก้นหลอด หรืออาจมีน้ำใสแยกกับก้อนแข็ง แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างกรดแลคติก (lactic acid) ได้จากน้ำตาลแลกโตส (lactose) ในนม ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของนมลดต่ำลง และกรดแลคติกจะไปรวมตัวกับโปรตีนคาซีอินทำให้โปรตีนคาซีอินเสียสภาพ (denature) เปลี่ยนแปลงเป็นลิ่มแข็ง เมื่อเอียงหลอดไปมาก้อนลิ่มแบบนี้จะคงตัวอยู่กับที่ เรียกลักษณะแบบนี้ว่า แอซิดเคิร์ด (acid curd) แบคทีเรียบางชนิดย่อยสลายโปรตีนคาซีอิน โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์เรนนิน (rennin like enzyme) ทำให้น้ำนมจับเป็นก้อนนิ่ม หรืออาจตกตะกอนเป็นลิ่มเล็กๆ ละเอียดๆ หรืออาจเห็นการแยกชั้นส่วนออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นน้ำใสๆ กับส่วนของลิ่ม ละเอียดจากโปรตีนคาซีอินที่เป็นตะกอนอยู่ก้นหลอด เรียกลักษณะแบบนี้ ว่าเรนเนท เคิร์ด (rennet curd) หรือ สวีทเคิร์ด (sweet curd) หรืออัลคาไลเคิร์ด (alkali curd) (จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2552)

2.5.1.3.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารที่มีเกลือในระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถบอกถึงสภาวะในการเจริญของเชื้อ และสามารถ นำไปใช้บอกความแตกต่างของเชื้อได้

2.5.1.3.7 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญแตกต่างกัน เราสามารถแบ่งเชื้อแอคติโนมัยสีทตามความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไซโครไฟล์ (psychrophile) เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 0 ถึง 20 องศาเซลเซียส มิโซไฟล์ (mesophile) เป็นแอคติโนมัยสีทที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง ประมาณ 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส และเทอร์โมไฟล์ (thermophile) เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ชอบ เจริญที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 55 ถึง 110 องศาเซลเซียส (Karp. 2010) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทมักอยู่ระหว่าง 23 ถึง 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ชอบเจริญที่อุณหภูมิ 20 ถึง 23 องศา เซลเซียส และบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส (Waksman. 1950)

2.5.1.3.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ เราสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทตามความสามารถในการเจริญ ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเป็นกรด-ด่างเป็น 3 กลุ่ม คือ แอซิโดไฟล์ (acidophile) เป็นแอคติโนมัยสีทที่ ชอบความเป็นกรด เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.4 นิวโทรไฟล์ (neutrophile) เป็น แอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.4

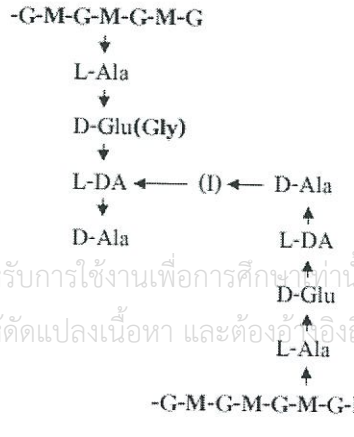
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึง 8.0 และอัลคาโลไฟล์ (alkalophile) เป็นแอคติโนมัยสีทที่ชอบความเป็นด่าง เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า8.0(Karp.2010)

2.5.2 ลักษณะทางเคโมไทป์ เป็นการศึกษาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างต่างๆ ของเซลล ได้แก่

2.5.2.1 กรดไดอะมิโนพิเมลิก(diaminopimelicacid,DAP)

แบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือเรียกว่า มิวรีอิน (murein) เปปติโดไกลแคน (รูปที่ 2.9) เป็นโครงสร้างที่ ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) เรียงสลับกับกรด เอ็น-อะซีติลมิวรามิก (N-acetylmuramic acid) โดยที่กรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิกจะมีกรดอะมิโนยื่น ออกมา และจะไปเชื่อมกับกรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิกของอีกโมเลกุลหนึ่งด้วย พันธะเปปไทด์ จำนวนและชนิดของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งชนิดของ กรดอะมิโนที่พบในเปปติโดไกลแคนนี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการจัดระบบของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอยางยิ่งในแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งรวมถึงเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วย โดยกรด 2, 6-ไดอะมิโนพิเมลิก (2, 6-diaminopimelic acid ; DAP) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเปปติโด ไกลแคน มีไอโซเมอร์ 2 แบบ คือ แบบ LL และ แบบ meso (DL, DD) ถ้าในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีกรดไดอะมิโนพิเมลิกประกอบอยู่ จะมีไอโซเมอร์ได้ 1 ชนิดเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย การตรวจสอบกรดไดอะมิโนพิเมลิกและไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิเมลิกนั้นเป็นขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบนั้นโดยปกติแล้วจะพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso ใน เปปติโดไกลแคนได้ทั่วไปในปริมาณน้อย ซึ่งการพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso ในแบคทีเรียแกรมลบนี้ไม่มีความสำคัญในการใช้จัดระบบของเชื้อ ไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิเมลิกสามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิเมลิกจะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟี แบบกระดาษ (paper chromatography) หรือ ใช้แผ่นโครมาโตกราฟี แบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) (Komagata และ Suzuki. 1987)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่2.9 โครงสร้างของเปปติโดไกลแคน

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

เชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล Streptomyces มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก เป็นแบบ LL ซึ่งจัดเป็นแอคติโนมัยสีททั่วไป (common actinomycetes) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยสีทใน สกุลอื่นๆ จัดเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก (rare actinomycetes) มีลักษณะไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิเมลิก เป็นแบบ meso แต่มีเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสกุล เช่น Kitasatospora มีไอโซเมอร์ ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก ทั้งสองแบบ คือ แบบ LL และ แบบ meso นอกจากนี้ยังสามารถพบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy-DAP) ได้ในเชื้อแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ เช่น ในสกุล Actinoplanes Ampullariella Dactylosporangium และ Micromonospora ซึ่งกรณีที่พบ กรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซีนั้น มักจะพบควบคู่กับกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso (Komagata และ Suzuki. 1987) ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของ ผนังเซลล์ที่มีความสำคัญในการใช้จัดกลุ่มผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท (Lechevalier และ Lechevalier. 1970)

Cell wall type	DAB	lysine	ornithine	aspartic acid	glycine	*meso*-DAP	*LL*-DAP	arabinose	galactose
I					+		+		
II					+	+**			
III						+			
IV						+		+	+
V		+	+		*				
VI		+		+	*				
VII	+	+		+	*				
VIII				+	*				

+ คือ แสดงการตรวจพบ, * คือ อาจตรวจพบหรือไม่พบ glycine, ** คือ อาจตรวจพบ hydroxy DAP

DAB คือ 2, 4 - diaminobutyric acid, DAP คือ 2, 6 - diaminopimelic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.2 ชนิดของacylในผนังเซลล์(acyltype)

ผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคนประกอบด้วยเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน เรียงสลับ กับกรดเอ็น-อะซิติลมิวรามิคโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 กลูโคซิดิก (ß-1,4 glucosidic) ในแบคทีเรียบางชนิดอาจพบหมู่ไกลโคลิล (glycolyl group) แทนที่ตำแหน่งของหมู่อะซีติล (acetyl group) ในโครงสร้างของกรดมิวรามิค โดยลักษณะของชนิดไกลโคลิล (glycolyl type) ที่พบในผนัง เซลล์ของแบคทีเรียนั้นสามารถพบได้ในเชื้อแอคติโนมัยสีทและแบคทีเรียจำพวกโครีนีฟอร์ม (coryneform bacteria) การศึกษานี้มีประโยชน์ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย การตรวจสอบสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์สี ทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณของกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ในระดับไมโครโมลล์ต่อมิลลิกรัมของเซลล์แห้งได้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบ ปริมาณมักไม่ใช้ในการจัดระบบแบคทีเรีย (Komagata และ Suzuki. 1987) ชนิดของ acyl ที่พบได้ เป็นส่วนมากในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมาก (major) ในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ (Uchida และ Seino. 1997)

วงศ์	ชนิดของ acyl
Cellulomonadaceae	acetyl
Dermatophilaceae	acetyl
Frankiaceae	acetyl
Micromonosporaceae	glycolyl
Mycobacteriaceae	glycolyl
Nocardiaceae	glycolyl
Nocardioidaceae	acetyl
Pseudonocardiaceae	acetyl
Sporichthyaceae	acetyl
Streptomycetaceae	acetyl
Streptosporangiaceae	acetyl
Thermomonosporaceae	acetyl

2.5.2.3 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cellsugar)

องค์ประกอบของน้ำตาลเป็นข้อมูลที่มักถูกนำไปใช้ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแอคติโนมัยสีท สามารถ ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งน้ำตาลทั้งหมด ภายในเซลล์จะถูกแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟี แบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้ แผ่นโครมาโตกราฟี แบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) (Komagata และ Suzuki. 1987) ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบในเซลล์ รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่พบสามารถช่วยใน จำแนกลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ (Lechevalier และ Lechevalier. 1970) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วย กรดไดอะมิโนพิมิลิกแบบ meso (Lechevalier และ Lechevalier. 1970)

Type	ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจพบ
A	galactose arabinose no xylose
B	madurose no arabinose or xylose
C	none
D	xylose arabinose

2.5.2.4 ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ฟอสโฟลิปิดมีลักษณะเป็น แอมฟิพาทิก (amphipatic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) โครงสร้างพื้นฐานและคำย่อของฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย แสดงไว้ในตารางที่ 2.6 การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดนิยม ทำโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ดีเวลอพแบบ 2 ทิศทาง (two-dimention) ซึ่งจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ตรวจพบจะจำเพาะกับรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ โดยชนิด ของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบสามารถใช้ในการจัดระบบ (systematics) ของแบคทีเรียได้ (Komagata และ Suzuki. 1987) Lechevalier และคณะ (1981) ได้จัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ซึ่งแสดงในตารางที่2.7

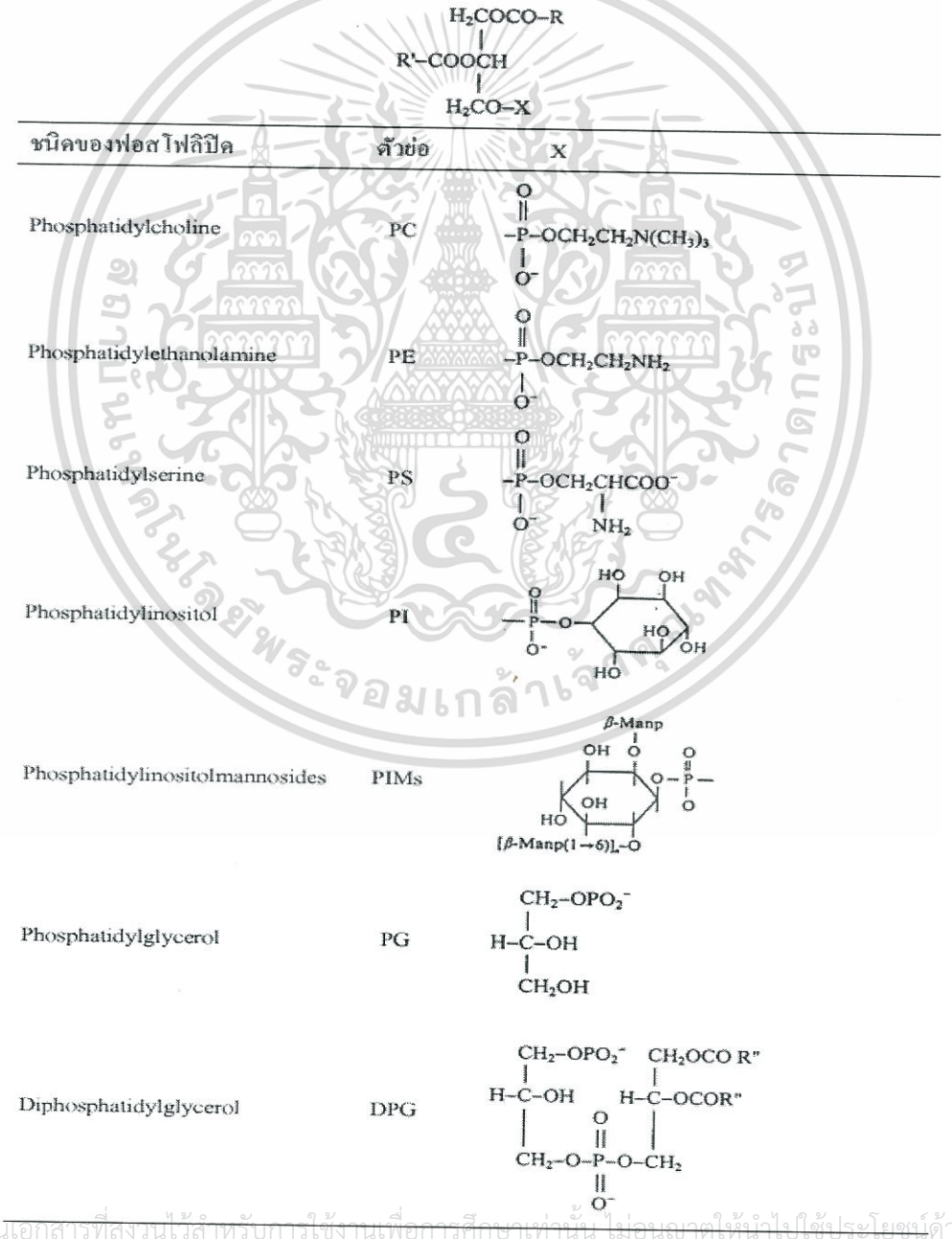
2.5.2.5 กรดไขมันในเซลล์(cellular fatty acid)

กรดไขมันเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์โดยไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นแอมฟิพาทิก คือ ปลายข้างหนึ่ง (hydrophilic head) ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ และปลายอีกข้างหนึ่ง (hydrophobic tail) ประกอบด้วย กรดไขมัน 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ประเภทของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (Kaur. 2005) เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดของกรดไขมันที่ แตกต่างกันโดยรูปแบบของกรดไขมันที่พบสามารถใช้ในการจัดระบบของเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ (Komagata และ Suzuki. 1987) สามารถแยกกรดไขมันที่พบในเซลล์ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) และวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันเทียบกับฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI)

ตารางที่ 2.6 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย (Komagata และ Suzuki. 1987)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีท (Lechevalier และคณะ. 1981)

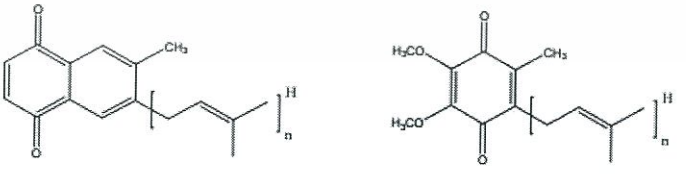
Phospholipids pattern	PE and its derivatives	PC	GluNU
PI	-	-	-
PII	+	-	-
PIII	V	+	-
PIV	+	-	+

GluNU คือ glucosamine containing phospholipids

V คือ variation

2.5.2.6 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน(isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็คตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่พบได้ มากที่สุด คือ มีนาควิโนน (menaquinones) และยูบิควิโนน (ubiquinones) (รูปที่ 2.10) ชนิดของ ควิโนนและจำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene units) ในสายโซ่ และระดับของการเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในหน่วยไอโซพรีน ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกและ พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย การตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนนและปริ มาณหน่วยของ ไอโซพรีนทำได้โดยใช้เครื่องแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry, MS) และพบว่าการ วิเคราะห์ โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟี แบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin-layer chromatography) สามารถวิเคราะห์ควิโนนได้อย่างรวดเร็ว และเครื่องโครมาโทกราฟ ของเหลวสมรรถนะสูงยังใช้แยก และตรวจสอบองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อย รวมทั้งยังใช้สำหรับ การวิเคราะห์ควิโนนในเชิงปริมาณได้ (Komagata และ Suzuki. 1987; Collins และคณะ. 1977)



menaquinone ubiquinones

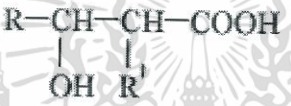
รูปที่2.10โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย

nคือจำนวนหน่วยของไอโซพรีน

H คือ จำนวนอะตอมของโฮโดรเจนที่เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนสในพันธะคู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.7 กรดมัยคอลิก (mycolic acid) กรดมัยคอลิก คือ กรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ มีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (2-alkyl-3-hydroxy fatty acids) (รูปที่ 2.11) ประกอบด้วยคาร์บอน 24-90 อะตอม มักพบในสกุล Mycobacterium Nocardia Rhodococcus และ Corynebacterium กรดมัยคอลิกจะพบอยู่ในแบคทีเรียทีมีผนังเซลล์ชนิดที่ IV (มีไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิมิลิกเป็นแบบ meso ทีผนังเซลล์ และมีน้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตสภายในเซลล์) กรดมัยคอลิกสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ กรดมัยคอลิกทีพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น ไกลโคลิปิด (glycolipids) ฟีโนลิกไกลโคลิปิด (phenolic glycolipids) หรือไกลโคเปปติโดลิปิด (glycopeptidolipids) (Komagata และ Suzuki. 1987 ; Liu. 1996)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของกรดมัยคอลิก(Komagata และ Suzuki. 1987)

R คือ คาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

R' คือ หมู่แอลคิล

2.5.3ลักษณะทางจีโนไทป์

ข้อมูลในสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อการศึกษาการจัดระบบ (systemetic) ของเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างมาก การศึกษาระบบของแบคทีเรียมักนิยมศึกษา ข้อมูลของ 16S rRNA gene บนสายดีเอ็นเอ เพื่อสืบหาสายวิวัฒนาการของเชื้อโดยการวิเคราะห์จาก ต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)การศึกษา 16S rRNA gene นี้มีกระบวนการดังนี้

2.5.3.1การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเวลาอันสั้น อาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อ สายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) และคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงต่ำตามความต้องการ โดยที่ไม่ทำให้ เอนไซม์นี้เสียความสามารถในการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกบดีเอ็นเอแม ่แบบทีปลาย 5' และปลาย 3'
3. ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) คือ dATP dTTP dGTP และ dCTP
4. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase)
5. โคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ได้แก่ Mg2+ หรือ Mn2+

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

(1) การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ(DNA denaturation)

เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบเกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยทำให้สายพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สองสายที่พันกันเป็นเกลียวดีเอ็นเอแยกออกจากกัน อุณหภูมิที่กล่าวถึงนี้ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบส (%G+C content) ในสายดีเอ็นเอทำให้ความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกัน

(2) การเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (annealing)

เป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อให้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิประมาณ 52 ถึง 58 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (melting temperature, TM) ของสายดีเอ็นเอไพรเมอร์

(3) การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension)

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ ไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ พอลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 ถึง 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอน กระบวนการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะเป็นการดำเนินของขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว ซึ่งเมื่อครบประมาณ 30 รอบจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 230 หรือประมาณ 109 โมเลกุล โดยทั่วไปนิยมใช้ 20 ถึง 35 รอบ (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552)

2.5.3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดกันมากพอที่จะมีดีเอ็นเอที่คล้ายกันมากแต่ก็ยัง มีไรโบโซมที่คล้ายกัน ไรโบโซมเป็นโครงสร้างเล็กๆ ภายในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) สร้างโดยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ในแบคทีเรียทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนไปน้อยมาก ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตสองตัวจะมีความใกล้ชิด กันน้อยและไม่มีดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่ก็ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) คล้ายกัน ความคล้ายคลึงกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดระหว่าง สิ่งมีชีวิตได้ในระดับสกุล (genus) วงศ์ (family) และอันดับ (order) ความคล้ายคลึงกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) และไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แคตตาล็อกกิ้ง (rRNA oligonucleotide cataloging) เป็นวิธีใหม่ที่ใช้หาความคล้ายคลึงกันของไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิส ตรอน (rRNA cistron) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ(นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544)

วิธีการตรวจหาลำดับเบสบนดีเอ็นเอช่วยในการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งต่างๆ วิธีการตรวจหาลำดับเบสดีเอ็นเอมีหลายวิธี วิธีที่เป็น ที่นิยมเป็นกระบวนการของ Sanger ซึ่งอาศัยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำ ปฏิกิริยาต่อสายดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอสายสั้นๆ จากนั้นติดฉลากสารรังสีที่มีความจำเพาะกับเบส แต่ละชนิดที่ปลายของสายดีเอ็นเอ และตรวจสอบลำดับเบสโดยอาศัยการแยกสายดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นเจลที่ทำด้วยพอลิเอคริลเลไมด์ (polyacrylamide gel electrophoresis) (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552)

ปัจจุบันมีเครื่องมือสำเร็จรูปทำให้การหาลำดับเบสนี้ทำได้สะดวกรวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น การติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเบสแต่ละชนิดอาศัยสารไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide : ddG ddA ddT ddC) ที่ทำให้เกิดสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีสีแตกต่างกัน ทำให้ สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็วและไม่ต้องใช้สารรังสี (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552)

2.5.3.3 ปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยคู่ของเบส คือ กวานีน (G) คู่กับไซโทซีน (C) และอะดีนีน(A) คู่กับไทมีน (T) จำนวนของนิวคลีโอไทด์เบสในดีเอ็นเอคิดเป็นร้อยละของกวานีนกบไซโตซีน รวมกนที่เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mol% G+C ค่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ในสปีชีส์ที่ใกล้กันจะมี mol% G+C คล้ายกันมาก ถ้าสิ่งมีชีวิตมี mol% G+C ต่างกันมาก แสดงว่าไม่ค่อยมีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกัน แต่ก็อาจมีบางกรณีที่สิ่งมีชีวิตที่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลย แต่มี mol% G+C คล้ายกันก็ได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544)

2.5.3.4 ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน(DNA-DNA Hybridization)

ถ้าให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) แต่ละสายของดีเอ็นเอ ที่เข้าคู่กันจะแยกออกเพราะพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ถูกทำลาย และเมื่อทิ้งให้เย็น สาย ของดีเอ็นเอจะกลับมาจับคู่ (base pairing) กันได้อีก โดยอาศัยหลักการจับคู่เบสของดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ หลักการนี้ในการศึกษาหาความคล้ายกันของลำดับเบสของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ถ้า สิ่งมีชีวิตสองชนิดนั้นมีความคล้ายคลึงกันมากหรือใกล้ชิดกันมาก ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองจะ สามารถจับคู่กัน (hybridize) ได้ ดังนั้นในการศึกษาหาความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งสองมาให้ความร้อนให้แปลงสภาพ (denature) เพื่อแยกออกเป็นสายเดี่ยวๆ แล้วเอาสายเดี่ยวนั้นมาผสมกัน ทิ้งให้เย็น ถ้าสิ่งมีชีวิตสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันหรือใกล้เคียงกันจะเกิดการจับคู่ของสายดีเอ็นเอ (heteroduplex) คือสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งจับคู่กับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้งสองไม่ใกล้ชิดกันเลย จะไม่เกิดจากการจับคู่กันของสาย ดีเอ็นเอ วิธีนี้ใช้ทดสอบในระดับสปีชีส์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544)

2.6 ความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารที่มีบทบาทต่อสิ่งแวดล้อมที่ พวกมันอาศัยอยู่เพื่อเหตุผลในการดำรงชีวิตอยู่ของพวกมัน เช่น การสร้างสารยับยั้งการเจริญของ สิ่งมีชีวิตอื่น การสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ เป็นต้น ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน เช่น ทางการด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และทางด้านอุตสาหกรรม ซึ่งความสำคัญและประโยชน์ ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ได้แก่

2.6.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด (Birdy. 2005) สารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้น มีความหลากหลายสูงทั้งด้านโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ ชีวภาพ Sneader (2005) ได้กล่าวถึงสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทไว้เป็นกลุ่มดังนี้คือ

2.6.1.1 กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์(aminoglycosides)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) เชื่อมต่อด้วย พันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond)ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้โดยตรง (bactericidal) มีผลยับยั้ง การสังเคราะห์โปรตีนโดยรบกวนการแปลรหัสจาก mRNA ไปเป็นโปรตีน สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่

(1) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ผลิตโดย Streptomyces griseus มีฤทธิ์ต้านเชื้อ Mycobacterium tuberculosis และจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกาฬโรค(plague)โรคบรูเซลโลซิส (brucellosis) และแบคทีเรียต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง สเตรปโตมัยซินถูก นำไปใช้เป็นยาอันดับแรก (first line) ในการรักษาวัณโรคแต่การใช้ในปริมาณมากเป็นอันตรายต่อ เส้นประสาทหู ซึ่งเป็นผลให้เกิดอาการหูหนวกได้ จึงอนุญาตให้ใช้ในปริมาณน้อยร่วมกับยาต้านวัณโรคที่เกิดจากการสังเคราะห์

(2) นีโอมัยซิน (neomycin) เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อน (antibiotic complex) ผลิตโดย Streptomyces fradiae ส่วนประกอบที่ใช้รักษาโรค คือ นีโอมัยซิน-บี (neomycin B) มีความเป็นพิษต่อระบบประสาท(neurotoxicity)นำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังหูและตา

(3) กานามัยซิน (kanamycin) เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อนผลิตโดย Streptomyces kanamyceticus สารประกอบหลัก คือ กานามัยซิน-เอ (kanamycin A) มีความเป็นพิษ เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆ ใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อจาก Staphylococcus ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน (penicillin) และการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาเจนทาไมซิน

(4) ลินโคมัยซิน (lincomycin) ผลิตโดย Streptomyces lincolnensis เป็นยาที่มีความเป็นพิษสูง ในเวลาต่อมาจึงมีการพัฒนาคลินดามัยซิน (clindamycin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของลินโคมัยซินมาใช้แทนโดยมีกิจกรรม(activity)ที่คล้ายกันแต่มีประสิทธิภาพมากกว่า

(5) เจนทาไมซิน-ซี$_1$ (gentamicin C_1) แยกได้จากสารปฏิชีวนะเชิงซ้อน ซึ่งผลิตโดน Micromomospora purpurea และ M. echinospora เจนทาไมซินเป็นทางเลือกในการนำประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น ต้านการติดเชื้อจาก Pseudomonas

2.6.1.2 กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล(chloramphenicol)

คลอแรมเฟนิคอล เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum antibiotic) ผลิตโดย Streptomyces venezuelae ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยการจับกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม ทำให้การสร้าง เอนไซม์เปปติดิลทรานสเฟอเรส (peptidyl transferase) ถูกยับยั้งจนไม่สามารถสร้างพันธะเปปไทด์ ได้ คลอแรมเฟนิคอลใช้รักษาโรคไทฟอยด์ โรคจากการติดเชื้อ Salmonella โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และโรคจากการติดเชื้อริกเก็ตเซีย นอกจากนี้ยังใช้รักษาการติดเชื้อที่ตาและหู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.3 กลุ่มเตตราซัยคลิน(tetracycline)

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยวงอะโรมาติกต่อกัน 4 วง เป็นสารปฏิชีวนะที่ ออกฤทธิ์กว้าง โดยออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ โปรตีน โดยการจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลอร์เตตรา ซัยคลิน (chlortetracycline) ผลิตโดย Streptomyces aureofaciens ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) ผลิตโดย Streptomyces rimosus และดีมีโคลซัยคลิน (demeclocycline) ผลิตโดย Streptomyces aureofaciens ที่เกิดการกลายพันธุ์

2.6.1.4 กลุ่มแมคโครไลด์(macrolide)

โมเลกุลมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 20 อะตอม มีวงแลคโตนแมคโครไลด์ (macrocyclic lactone ring) หรือวงแลคแตมแมคโครไลด์ (macrocyclic lactam ring) เป็นองค์ประกอบหลักออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) โดยจับกับหน่วยย่อย 50Sของไรโบโซมมีผลให้การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้งสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่

(1) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) ผลิตโดย Streptomyces erythreus เป็นสารปฏิชีวนะชนิดแรกในกลุ่มนี้ที่นำไปใช้ในทางคลินิก อิริโทรมัยซินมีการออกฤทธิ์คล้ายกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) โดยที่โครงสร้างทางเคมีนั้นไม่มีความสัมพันธ์กัน สามารถนำไปใช้ในผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนนิซิลลิน หรือใช้ในการรักษาการติดเชื้อ Staphylococcus ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลินได้ นอกจากนี้อิริโทรมัยซินยังเป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ผิวหนังเนื้อเยื่ออ่อนและระบบทางเดินหายใจ

(2) ราปามัยซิน (rapamycin)ผลิตโดย Streptomyces hygroscopicus มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ Candida albicans และเชื้อราบางชนิด

2.6.1.5 กลุ่มไรฟามัยซิน(rifamycin)

โครงสร้างประกอบด้วยวงอะโรแมติก (aromatic ring) เชื่อมต่อกันด้วย อะลิฟาติกบริดจ์ (aliphatic bridge) ไรฟามัยซินผลิตโดย Nocardia mediterranei ออกฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวกและ Mycobacterium tuberculosis สามารถดัดแปลงไรฟามัยซินต่อได้ เป็นไรฟามัยซิน-บี (rifamycin B) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ปานกลางเมื่อนำไปใช้กับสัตว์ แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา จึงได้มีการพัฒนา ไรฟามัยซิน-เอสวี (rifamycin SV) ที่ออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวางขึ้นมาแทน สามารถยับยั้ง Mycobacterium tuberculosis M. leprae แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ บางชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.6 กลุ่มโพลีอีน(polyene)

โครงสร้างโมเลกุลมีขนาดใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและยีสต์(antifungal)สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่

(1) นิสเตติน (nystatin) ผลิตโดย Streptomyces noursei และ Streptomyces aureus เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ เนื่องจาก นิสเตตินมีความเป็นพิษสูงจึงถูกจำกัดในการใช้รักษาการติดเชื้อจาก Candida albicans ที่ผิวหนัง และเนื่องจากมันไม่ถูกดูดซึมจากลำไส้ จึงสามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อ Candida albicans ใน ช่องปากและลำไส้

(2) แอมโฟเทอริซิน (amphotericin) ผลิตโดย Streptomyces nodosus เป็นสารปฏิชีวนะที่มีความเป็นพิษ แต่มีความปลอดภัยพอที่จะใช้ในการรักษาการติดเชื้อรา ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากการรักษาโรคมะเร็งด้วยการทำเคมีบำบัดหรือเนื่องจากโรคเอดส์ แอมโฟเทอริซินมีการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยจะจับกับเออโกสเตอรอล (ergosterol) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ เกิดการสูญเสียโพแทสเซียมและ สารต่างๆ ในเซลล์ แต่แอมโฟเทอริซินก็สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ได้เช่นกัน

2.6.1.7 กลุ่มอะโซมัยซิน(azomycin)

อะโซมัยซิน ผลิตโดย Streptomyces ที่ยังไม่ระบุสปีชีส์ มีความเป็น พิษสูงมาก จึงมีการพัฒนาสารได้เป็นเมโทรไนดาโซล (metronidazole) ใช้ฆ่าโปรโตซัว และ แบคทีเรีย

2.6.1.8 กลุ่มแวนโคมัยซิน(vancomycin)และไตโคพลานิน(teicoplanin)

แวนโคมัยซิน ผลิตโดย Streptomyces orientalis มีฤทธิ์ต้านการเจริญ ของแบคทีเรียแกรมบวกทั้งชนิดที่ต้องการอากาศและชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญโดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มสแตปฟีโลคอคไค(staphylococci) โดยออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แวนโคมัยซินที่มีความบริสุทธิ์ใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดในช่องปากแต่การใช้แวนโคมัยซินที่ไม่บริสุทธิ์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effects)สูง

ไตโคพลานิน(teicoplanin)เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อนผลิตโดย Actinoplanes teichomycetius มีการออกฤทธิ์เหมือนกับแวนโคมัยซิน แต่มีการคงอยู่ในร่างกาย (half-life) นานกว่า และมีการระคายเคืองน้อยกว่า สามารถฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อหรือเส้นเลือดได้ โดยตรง

2.6.1.9 ธิอีนามัยซิน(thienamycin)

ธิอีนามัยซินเป็นสารในกลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenem) ซึ่งเป็นกลุ่มของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์มากและมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้สูง แยกได้จาก Streptomyces กว่า 40 ชนิด โดยธิอีนามัยซิน เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดใน กลุ่มนี้ ผลิตโดย Sterptomyces cattleya มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคน มีคุณสมบัติทนต่อ เอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส (β-lactamase) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

2.6.1.10 กลุ่มกรดคลาวูลานิก(clavulanic acid)

เชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส (β-lactamase) นั้น สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) และซีฟาโลสปอริน (cephalosporin) ได้ จึงมีการค้นหายาที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส โดยกรดคลาวูลานิก แม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ แต่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส จึงมีการใช้กรดคลาวูลานิกร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่นเช่น อะม็อกซีซิลลิน (amoxicillin) ซึ่งการใช้ ตัวยาร่วมกัน (combination) ระหว่างกรดคลาวูลานิกกับยาชนิดอื่นนั้น ได้รับการพัฒนาเป็นยาที่ขาย ในท้องตลาด และทางการแพทย์ได้แล้ว โดยใช้รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ และทางเดิน ปัสสาวะ

2.6.2 การสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Sneader (2005) อธิบายว่า การค้นหาสารต้านเซลล์มะเร็งจากธรรมชาติเริ่มต้นจาก Selman Waksman ได้แยกแอคติโนมัยซิน-เอ (actinomycin A) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง sarcoma- 180 ต่อมาในปี 1949 Hans Brockmann ได้แยกแอคติโนมัยซิน-ซี (actinomycin C) จากเชื้อ Streptomyces chrysomallus ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และในปี 1953 Waksman ได้แยกแอคติโนมัยซิน-ดี (actinomycin D) หรือแดคติโนมัยซิน (dactinomycin) จาก Streptomyces parvullus ซึ่งใช้รักษามะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue sarcomas) และเนื้องอกที่อัณฑะ (testicular teratomas) นอกจากนี้ในเวลาต่อมาก็ได้มีการค้นพบสารยับยั้งเซลล์มะเร็งอีกหลายกลุ่ม เช่น

2.6.2.1 บลีโอมัยซิน(bleomycin)

บลีโอมัยซินเป็นสารเชิงซ้อนในกลุ่มไกลโคเปปไทด์ (glycopeptides) ผลิตโดย Streptomyces verticillus สารที่เป็นส่วนประกอบหลักที่ใช้ในทางคลินิก คือ บลีโอมัยซิน-เอ2 (bleomycin A_2) คุณลักษณะที่โดดเด่นที่สุดของบลีโอมัยซิน คือ เป็นหนึ่งในยา ต้านมะเร็งเพียงไม่กี่ชนิดที่ไม่กดการสร้างเม็ดเลือดขาวในไขกระดูก แต่อาจเป็นอันตรายต่อปอด โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ บลีโอมัยซินใช้รักษาโรคมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า (squamous cell carcinoma) เนื้องอกที่ศรีษะและคอ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจ์กิน (nonHodgkins's lymphoma) และเนื้องอกที่อัณฑะ (testicular teratomas)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.2 สารในกลุ่มแอนทราซัยคลิน(anthracycline)

สารยับยั้งเซลล์มะเร็งในกลุ่มแอนทราซัยคลินได้แก่

(1) ดาวโนรูบิซิน (daunorubicin) ผลิตโดย Streptomyces peucetius แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอกคล้ายแอคติโนมัยซิน (actinomycin) โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการจำลอง ดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ 57

(2) ดอกโซรูบิซิน (doxorubicin) เป็นอนุพันธ์ของดาวโนรูบิซิน ใช้ รักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอนฮอดจ์กิน (non-Hodgkins's lymphoma) และมะเร็งชนิดเป็นก้อน(solid tumours)

(3) อะคลารูบิซิน (aclarubicin) ผลิตโดย Streptomyces galilaeus การนำไปใช้ในการรักษาคล้ายกับดาวโนรูบิซินและดอกโซรูบิซิน

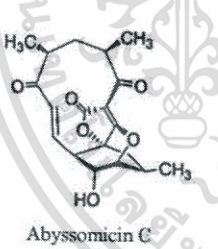
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ได้กล่าวมานั้นส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในสกุล Streptomyces แต่ก็สามารถพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้เช่นกัน โดยในปัจจุบันมีความสนใจค้นหาสารจากออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จาก เชื้อแอคติโนมัยสีทหายากมากขึ้น ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัย สีทหายาก แสดงในตารางที่ 2.8 และโครงสร้างของสารแสดงในรูปที่ 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

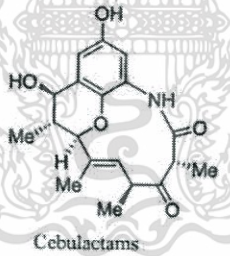
ตารางที่ 2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

สารประกอบ	สายพันธุ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Abyssomicin C	*Verrucosispora* sp.	antibacterial	Riedlinger และคณะ, 2004
Cebulactams	*Saccharopolyspora cebuensis*	antibacterial antioxidant	Pimentel-Elardo และคณะ, 2008
Chandrananimycins	*Actinomadura* sp.	antialagl antibacterial anticancer antifungal	Maskey และคณะ, 2003
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	antibacterial anticancer	Soria-Mercado และคณะ, 2005
Diazepinomicin (ECO-4601)	*Micromonospora* sp.	antibacterial anticancer anti-inflammatory	Charan และคณะ, 2004
Helquinoline	*Janibacter limosus*	antibacterial	Asolkar และคณะ, 2004
Mechercharmycins	*Thermoactinomyces* sp.	anticancer	Kanoh และคณะ, 2005
Proximicin A	*Verrucosispora* sp.	anticancer	Fiedler และคณะ, 2008
Salinosporamide A (NPI-0052)	*Salinispora tropica*	anticancer	Feling และคณะ, 2003

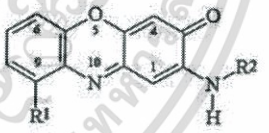
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตไจากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก



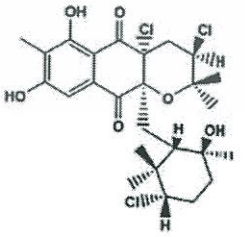
Abyssomicin C



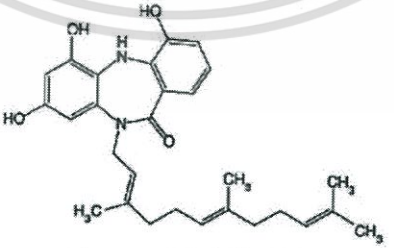
Cebulactams



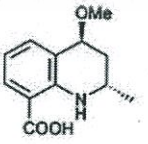
Chandrananimycins



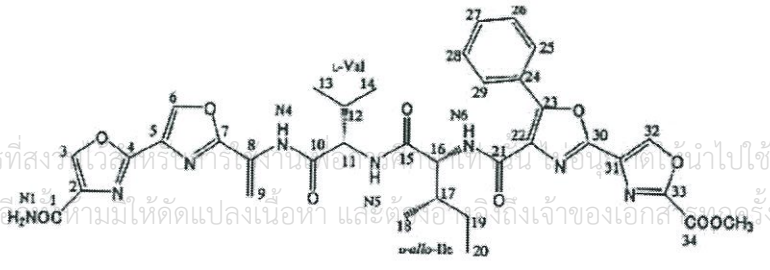
Chloro-dihydroquinones



Diazepinomicin (ECO-4601)



Helquinoline



Mechercharmycins

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 การสร้างวิตามิน

ตั้งแต่ Rickes และคณะ (1948) ได้เปิดเผยว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ ซึ่งมีผลทำให้เกิดความสนใจในการใช้สิ่งมีชีวิตนี้เป็นแหล่งในการผลิตวิตามินบี 12 ในเชิง พาณิชย์ เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวนมากสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้เมื่อมีเติมเกลือโคบอลท์ (cobalt salts) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น (precursors) การตรวจสอบการสร้างวิตามินบี 12 สามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางจุลชีววิทยา (microbiological assays) เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้าง วิตามินบี 12 ส่วนใหญ่เป็นเชื้อสกุล Streptomyces โดยเชื้อ S. griseus จะสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ออกมาด้วย แต่มีเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล Streptomyces หลาย สายพันธุ์ เช่น S. fradiae และ S. aureofaciens สามารถสร้างวิตามินบี 12 ได้โดยผลผลิตที่ได้ ปราศจากสารปฏิชีวนะส่วนเชื้อสกุลอื่นที่ผลิตวิตามินบี12 ได้ เช่น Nocardia rugosa เป็นต้น(Waksman. 1959)

Saunders และคณะ (1952) ได้คัดกรองเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างวิตามินบี 12 จากเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดจำนวน 90 ไอโซเลต โดยทดสอบในอาหารซอยบีน มีล (soybean meal medium) ที่มีการเติมโคบอลท์ (cobalt) พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 4 ไอโซเลต สามารถสร้างวิตามินบี 12 ในปริมาณที่สูงกว่าชุดการทดลองควบคุมของ Streptomyces griseus อย่างมีนัยสำคัญโดยในจำนวนนี้มีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต พบว่าเป็นเชื้อ S. griseus ให้ผลผลิตประมาณ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ไม่ใช่ S. griseus ให้ผลผลิตประมาณ 1.63 ถึง 1.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6.4 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของพวกมันเอง หรือต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับพวกมัน(Waksman. 1950)เช่นการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของ พืชเป็นต้น

Shrivastava และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืช ชนิดหนึ่ง จากเชื้อ Kitasatospora sp. ที่แยกได้จากดิน โดยทำการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงจะผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกที่ความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง ระยะเวลาที่นานขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกตรึง

Khamna และคณะ (2010) รวบรวมเชื้อ Streptomyces spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณราก พืชสมุนไพรไทยจำนวน 14 ชนิด พบว่าเชื้อดังกล่าวมีการผลิตฮอร์โมนพืช (กรดอินโดล-3-อะซีติก) ในอาหารยีสต์มอลต์เอ็กแทรกท์ (yeast malt extract medium) ซึ่งเติม แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) ความเข้มข้น 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด อินโดล-3-อะซีติก มากที่สุด คือ เชื้อ Streptomyces sp. CMU-H009 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณราก ตะไคร้ (Cymbopogon citratus)

2.6.5 การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์

เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสลายสารประกอบอินทรีย์ต่างๆไม่ว่าจะเป็นโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ทำให้สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของพืชและสัตว์ในธรรมชาติ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน แหล่งน้ำ และปุ๋ยอินทรีย์ (compost) จากการศึกษาการย่อยสลายกรดอะมิโนพบวาเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายไกลซีน (glycine) และอะลานีน (alanine) ได้มี ประสิทธิภาพมากกวาเชื้อรา เชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสปีชีส์ (species) สามารถยอยสลายโปรตีนทั้ง ในพืชและสัตว์ได้ เช่น ซีอิน (zein) อีเดสติน (edestin) ไกลอาดิน (gliadin) แอลบูมิน (albumin) และคาซีอิน (casein) สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตต่างๆ เช่น น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส และ เฮมิเซลลู โลส สามารถย่อยสลาย สเตียรอยด์ต่างๆ เช่น คลอเรสเตอรอล (choresterol) สารประกอบอะโรแมติค (aromatic compounds) และอะเซทิลีน (acetylene) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ได้อีกมากมาย เช่น วุ้นจากสาหร่าย (agar) ยาง (rubber) พาราฟิน (paraffin) และลิกนิน(lignin)(Waksman. 1950)

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ได้เนื่องจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (endocellular enzyme) โดยเอนไซม์ที่สร้างได้มีหลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรตีเอส (protease) เอนไซม์อะไมเลส (amylases) เอนไซม์อินเวอเทส (invertase) เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic enzymes) และเอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นต้น (Waksman. 1950)

2.6.6 การตรึงไนโตรเจน

ตั้งแต่ช่วงปลายปี 1970 เป็นต้นมา นักวิทยาศาสตร์พบวาเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถตรึง ก๊าซไนโตรเจนได้โดยอยู่ร่วมกับพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้ในเขตอบอุ่นประเภทไม้เนื้ออ่อน และยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่ออยู่ร่วมกับรากข้าวในนาที่มีน้ำขัง โดยไม่จำเพาะเจาะจง เหมือนไรโซเบียมกับรากถั่วเท่านั้น (ไพรัตน์ พิมพ์ศิริกุล. 2546) มีรายงานว่าเชื้อสกุล Nocardia บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 12 มิลลิกรัม ต่อกรัมของเซลลูโลสที่ใช้ไป และยังมีเชื้อ แอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้คือเชื้อสกุล Frankia (Alexander. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Boondaeng และคณะ(2009) ได้ทำการศึกษา เชื้อ *Microbispora siamensis* sp. สายพันธุ์ใหม่ เป็นแอคติโนมัยสีททนความ ร้อน แยกได้จากดิน เป็นสายพันธุ์ DMKUA 245 ^{T} พบว่าเป็นแอคติโนมัยสี ททนความ ร้อน ที่ไม่เคลื่อนที่ เส้นใยอาหารมีสีเหลือง ในระหว่างการสร้างสปอร์ โคโลนีจะมีสีชมพูอ่อน รงควัตถุ สี เหลืองและเขียว ถูกสร้างจากการเลี้ยงในอาหาร ISP-2 และ ISP-3 เจริญได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Zucchi และคณะ(2012) ได้ทำการศึกษา เชื้อ *Amycolatopsis* 2 สายพันธุ์ใหม่แยกได้จากดินที่มี ความแห้งแล้ง เป็นสายพันธุ์ *A. thermophila* GY088 ^{T} และ *A. viridis* GY115 ^{T} โดยสามารถเจริญที่ อุณหภูมิ 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างกรดจาก แหล่งคาร์โบไฮเดรตได้ โดย เชื้อ 2ตัวนี้แยก ได้จาก ดินแห้งแล้งที่มาจากประเทศ ออสเตเรีย

Hao wu และคณะ(2015) ได้ทำการศึกษา เชื้อ *Thermoactinomyces guangxiensis sp.* สาย พันธุ์ใหม่ จากปุ๋ยหมักเห็ด โดย *T. guangxiensis* สายพันธุ์ CD-1 ^{T} เจริญได้ดี ในอาหาร HV medium, Sauton's agar, Bennett's agar, ISP3 และ ISP4 ไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำ มีการสร้างเส้นใยอากาศ สีขาว และ เส้นใยอาหารสีเหลือง เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

Hao wu และคณะ(2016) ได้ทำการศึกษา เชื้อ *Saccharopolyspora subtropica sp.* สายพันธุ์ใหม่ จาก ดินในไร่อ้อย พบว่าเป็นสายพันธุ์ T3 ^{T} ไม่สร้างกรด ไม่เคลื่อนที่ และชอบเจริญในที่อุณหภูมิสูงในช่วง 37 ถึง 50 องศาเซลเซียส ไม่สร้างรงควัตถุละลายน้ำ มีปริมาณเบส G+C ที่ 71.3 โมล%

Xiong Xu และคณะ(2012) ได้ทำการศึกษา เชื้อ *Microbispora* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากป่าชายเลนที่ ประเทศจีน พบว่า มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่มีในฐานข้อมูล(%similarity) ร้อยละ 98.75 และมีปริมาณเบส G+C ที่ 70.8 โมล %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 บริษัท Denver ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HM-35V บริษัท Hung Ta Instrument ประเทศไทย
4. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipette)
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX31 บริษัท Olympus
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น UC4-1320 ประเทศไทย
8. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น LF BH-120 บริษัท Unitech Science ประเทศไทย
9. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น ULE-500 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น SG-120 Steris ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Sorvall RC5C plus
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น Minispin plus ประเทศไทย
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction : PCR) รุ่น ALD-1244 บริษัท MJ Research
14. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop ND-1000 บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

2. *Escherichia coli* ATCC 25922

3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5. *Candida albicans* ATCC 10231

3.3 การเก็บตัวอย่างและตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นตัวอย่างที่เก็บมาจาก บ่อและธารน้ำร้อนคลึง อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างบริเวณผิวหน้าดินโดยลึกลงไปไม่เกิน 5 เซนติเมตร และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) โดยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ด้วยวิธีการ บดให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันแต่ไม่ต้องตำจนละเอียด และนำดินไปชั่งให้ได้ 10 กรัม ผสมน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีแล้วค่อยใช้ pH meter วัดโดยจุ่มไว้ในส่วนที่เป็นน้ำ

3.4 การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยให้ตัวอย่างผ่านกระบวนการ (treatment) ด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

3.41 การผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง(air-drying treatment)

นำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง เจือจางตัวอย่าง 1 กรัม ในสารละลาย SDS0.01%(Sodium dodecyl sulfate) และน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสาร (vortex) เป็นเวลา 1 นาที และเจือจางต่อในสารละลายเดียวกัน ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้มีความเจือจางที่ระดับ 10^{-1} ถึง 10^{-4} ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนจานอาหารสูตรดัดแปลงแซงสตาร์ท ซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (zhang'starch soil extract agar) และอาหารสูตรดัดแปลงซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar, modified) ซึ่งเติม กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และนิสตาติน (Nystatin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อครบเวลา 7 ถึง 28 วันแล้ว ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก โดยการเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีท ซึ่งทราบได้จากการสังเกตดูจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อขนาดเล็ก (micro needle) เขี่ยโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทมาขีดลากลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์ - มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract – malt extract agar, ISP2) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 21วัน หรือจนกระทั่ง เชื้อแอคติโนมัยสีทมีการเจริญมากพอสมควร จากนั้นทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยการขีดลากเชื้อลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์ - มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar) โดยวิธีครอส สตีก (cross streak) เพื่อให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว (single colony) นำเชื้อที่แยกได้มาวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และศึกษาลักษณะด้านอื่นๆต่อไป

3.5 การเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยสีท

ทำการเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์ (pure culture) ลงในหลอดอาหารเอียง(slant) ยีสต์เอ็กแทรกท์ - มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 21 วัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้งานในช่วงเวลาสั้นๆ ทำการเก็บรักษาเชื้อเพื่อให้ใช้งานได้เป็นเวลาหลายปี โดยนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์ มาเลี้ยงลงบนอาหาร ยีสต์เอ็กแทรกท์ - มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 ถึง 21 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญอยู่เก็บลงในหลอดที่มีสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และทำการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อทุกปี

3.6 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่มีความน่าสนใจ

ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความน่าสนใจนำมาศึกษา โดยมีแนวทางในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท 2 แนวทางดังนี้

3.6.1 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความโดดเด่นทางด้านอนุกรมวิธานทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความโดดเด่นทางด้านอนุกรมวิธานและมีจำนวนสมาชิกอยู่น้อยในแต่ละกลุ่มโดยการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลักษณะของสปอร์ลักษณะของโคโลนี และลักษณะของเส้นใย ตลอดจนพิจารณาจากค่าร้อยละความคล้ายคลึงของ16S rRNA gene (%16S rRNA gene similarity)

3.6.2 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์

3.6.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar cross streak (Waksman. 1940)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาเลี้ยงบนอาหารยีสต์ เอ็กแทรกท์-มอลท์ เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar, ISP2) โดยขีดเชื้อเป็นเส้นยาวบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบมาขีดในแนวตั้งฉากกับโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยขีดให้ชิดกับขอบโคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตรวจผลโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231

3.7 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)

3.7.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทลงบนอาหารสูตรดัดแปลงซอยเอ็กแทรกท์ เอการ์ (soilextract agar, modified) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ ตรวจดูลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-workingdistance) กำลังขยาย 400 เท่า

3.7.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากโดยการเลี้ยงลงบนอาหารอาหารต่างๆ ตาม International Streptomyces Project (ISP) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract - malt extract agar, ISP2)อาหารโอทมีล เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ชเอการ์ (inorganic salts - starch agar, ISP4) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์(glycerol - asparagine agar, ISP5) อาหารเปปโตน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์(peptone-yeast extract iron agar, ISP6) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar,ISP7) โดยการทำเป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) หรือสารละลายเซลล์(cell suspension) แล้วหยดลงบนอาหารต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยดูการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system)(Kelly. 1964)

3.7.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1.3.1 การใช้แหล่งคาร์บอน(carbon utilization)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล เอการ์ (basal agar medium, ISP9) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ กับชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

(1) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวกให้บันทึกผลเป็นบวก(+)

(2) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวกให้บันทึกผลเป็นปานกลาง(±)

(3) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส(D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-แมนโนส (D-mannose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-มอลโตส (D-maltose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล (glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.7.1.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง(starch hydrolysis)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salts starch agar, ISP4) (Shirling และ Gottlieb. 1966) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำสารละลายไอโอดีนลาดลงบนผิวอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.7.1.3.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน(gelatin liquefaction)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวบูลอิลลอน เจลาติน (bouillon gelatin broth) (Arai. 1975) บ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจผลโดยการนำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

3.7.1.3.4 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต(nitrate reduction)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวเปปโตน โพแทสเซียมไนเตรต (peptone KNO_3) (Arai. 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ปริมาตร 2 หยด และสารละลายไดเมทิลแนปทิลลามีน (N,N-dimethyl-1-naphthylamine) ปริมาตร 3 หยด หากมีการเปลี่ยนรูป ไนเตรตเป็นไนไตรต์สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

3.7.1.3.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

(1) นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวสกิมมิลค์ (skim milk) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14วันหากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้อาหารจะมีลักษณะใส

(2) นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็งสกิมมิลล์ (skim milk) (Gordon และคณะ. 1974) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.7.1.3.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extractmaltextract agar, ISP2) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 2 3 4 5 6 และ7 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.7.1.3.7 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extractmaltextract agar, ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 37 42 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.7.1.3.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extractmaltextract agar, ISP2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อ

3.7.1.3.9 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต (acid production from carbohydrates)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอล อินออร์แกนิก ไนโตรเจน (basal inorganic nitrogen medium) (Gordon และคณะ. 1974) ที่เติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารทดสอบโดยหากเชื้อสามารถสร้างกรดได้อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) น้ำตาลดี-ไรโบส (D-Ribose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลแอล-อะราบิโนส(L-arabinose) น้ำตาลดี-ราฟฟิ โนส (D-raffinose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) กลีเซอรอล(glycerol) และน้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.7.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype)

3.7.2.1 การแยกดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE buffer 1 ครั้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 380ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล :คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอลล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 :24 : 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3Msodium acetate) ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้งแล้วนำไปละลายในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร (Yukphan. 2006)

3.7.2.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ ปราศจากอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีนโดยเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอส ที1 (RNase T1) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในดีเอ็นเอซึ่งละลายในสารละลายซาลีน-โซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 1 เท่า (1x saline-sodiumcitrate, 1xSSC) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง12 ชั่วโมง เติมสารละลายเอนไซม์โปรตีเนส เค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง12 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (phenol : chloroform :isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือเป็นเวลา 5 นาทีนำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate) ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้ว80เติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้งแล้วนำไปละลายในสารละลายซาลีน-โซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 1 เท่า (Yukphan. 2006) ทำซ้ำเช่นเดิมอีก 1-2 ครั้ง

3.7.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส(polymerase chain reaction,PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตรดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (thermal cycler) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ตั้งเอาไว้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงในตารางที่ 3.2 (Yukphan และคณะ. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
primer : 20F*	10 pmol/μl	4.0 μl
primer : 1500R*	10 pmol/μl	4.0 μl
dNTP	2.0 mM	10.0 μl
10X *Taq* buffer	10X	10.0 μl
$MgCl_2$	25.0 mM	8.0 μl
Taq DNA Polymerase	5 Unit/μl)	0.5 μl
Milli Q water	-	59.5 μl
Template DNA	100-200 ng/μl	4.0 μl
รวม		100.0 μl

*primer : 20F (5' GAG TTT GAT CCT GCT CAG 3')

*primer : 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3')

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซียส	3 นาที	1	denaturation step
94 องศาเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซียส	1 นาที		annealing step
72 องศาเซียส	2 นาที		extension step
72 องศาเซียส	3 นาที	1	
รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที			

3.7.2.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)ให้มีความบริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ของบริษัท Geneaid ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีPB solution ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 9,000รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์อันใหม่ เติม EB bufferปริมาตร 25 ไมโครลิตรใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.7.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene (DNA sequencing)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ bigdyeterminator cycle sequencing ready reaction kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.4 (Yukphan และคณะ. 2005)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Big dye terminator	-	2.0 ไมโครลิตร
5X sequencing Buffer	5 เท่า	1.5 ไมโครลิตร
Sequencing Primer*	1.6 (pmol/μl)	1.0 ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	-	3.5 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	-	2.0 ไมโครลิตร
		10 ไมโครลิตร

*Primer 27F : AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T

520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG

1492R : TAC CAG GGT ATC TAA TCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม Big_dye

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ(cycle)
96 องศาเซียส	3 วินาที	1
96 องศาเซียส	10 วินาที	25
50 องศาเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซียส	4 นาที	1

3.7.2.6 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ(phylogenetic analysis)

ทำการจัดเรียง(alignment)ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignmentsoftware ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package จำลองข้อมูลเป็น multi-data setและสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.4 package (www.megasoftware.net/) (Yukphan และคณะ. 2005)

3.8 สถานที่ทำการทดลอง

1. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากบ่อและธารน้ำร้อนคลึง

จากดินตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากแต่ละจุดของบ่อและธารน้ำร้อนคลึงจังหวัดราชบุรี มาทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยจากสภาพแวดล้อมที่รุนแรง โดยการผึ่งดินตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air-drying treatment) แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร selective media เพื่อทำการคัดแยกเชื้อ ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 สามารถแยกได้ 7 ไอโซเลต จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 สามารถแยกได้ 9 ไอโซเลต จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 สามารถแยกได้ 4 ไอโซเลต และจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 สามารถแยกได้ 5 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 25 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำมาศึกษาในด้านสรีระวิทยาและชีวเคมีต่อไป

4.1.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแต่ละจุด นำมาทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี โดยดูจากลักษณะการเจริญบนสภาวะต่างๆ การย่อยหรือใช้สารอาหารต่างๆดังตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ (ร้อยละ)								ความเป็นกรด-ด่าง									อุณหภูมิ(°C)						Skim milk	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลายแป้ง
	1	1.5	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	8	9	10	11	12	30	37	40	42	45	50	Peptonization			
RT 1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 1-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 1-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-w
RT 1-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
RT 1-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-
RT 1-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ								ความเป็นกรด-ด่าง									อุณหภูมิ(°C)						Skim milk	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลายแป้ง
	1	1.5	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	8	9	10	11	12	30	37	40	42	45	50	Peptonization			
RT 2-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
RT 2-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-w
RT 2-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+/-	-
RT 2-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+/-	-
RT 2-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+/-	-
RT 2-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 2-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-
RT 2-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 2-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ (ร้อยละ)								ความเป็นกรด-ด่าง									อุณหภูมิ(°C)						Skim milk	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลายแป้ง
	1	1.5	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	8	9	10	11	12	30	37	40	42	45	50	Peptonization			
RT 3-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 3-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 3-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 3-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 4-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+
RT 4-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+
RT 4-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ (ร้อยละ)								ความเป็นกรด-ด่าง								อุณหภูมิ(°C)						Skim milk	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลายแป้ง
	1	1.5	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	8	9	10	11	12	30	37	40	42	45	50	Peptonization			
RT 4-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
RT 4-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หลังจากทำการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมีแล้ว จึงได้ทำการแบ่งกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ออกเป็นกลุ่มๆ (แบ่งกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี) ได้ทั้งหมด 13 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเชื้อไอโซเลตต่างๆดังนี้

กลุ่มที่ 1 RT1-1,RT1-2 และ RT1-3 **กลุ่มที่ 2** RT1-4 และ RT 1-5 **กลุ่มที่ 3** RT1-6 และ RT1-7 **กลุ่มที่ 4** RT2-1 และ RT2-2 **กลุ่มที่ 5** RT2-3,RT2-4 และ RT2-5 **กลุ่มที่ 6** RT2-6 **กลุ่มที่ 7** RT2-7 **กลุ่มที่ 8** RT2-8 และ RT2-9 **กลุ่มที่ 9** RT3-1,RT3-2 และ RT3-3 **กลุ่มที่ 10** RT3-4 **กลุ่มที่ 11** RT4-1 และ RT4-2 **กลุ่มที่ 12** RT4-3 **กลุ่มที่ 13** RT4-4 และ RT4-5

ทำการคัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อนำมาศึกษาในระดับจีโนไทป์ต่อไปดังนี้

กลุ่มที่ 1 RT1-2 กลุ่มที่ 2 RT1-4 กลุ่มที่ 3 RT1-7 กลุ่มที่ 4 RT2-2 กลุ่มที่ 5 RT2-4 กลุ่มที่ 6 RT2-6 กลุ่มที่ 7 RT2-7 กลุ่มที่ 8 RT2-9 กลุ่มที่ 9 RT3-1 กลุ่มที่ 10 RT3-4 กลุ่มที่ 11 RT4-1 กลุ่มที่ 12 RT4-3 กลุ่มที่ 13 RT4-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 RT1-1,RT1-2 และ RT1-3

ตัวแทนกลุ่ม RT1-2

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำสีเหลือง และมีสปอร์เดี่ยวอยู่ส่วนปลายของเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , เจลาติน , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-2

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 RT1-4และ RT1-5

ตัวแทนกลุ่ม RT1-4

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , เจลาติน , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-4

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 RT1-6 และ RT1-7

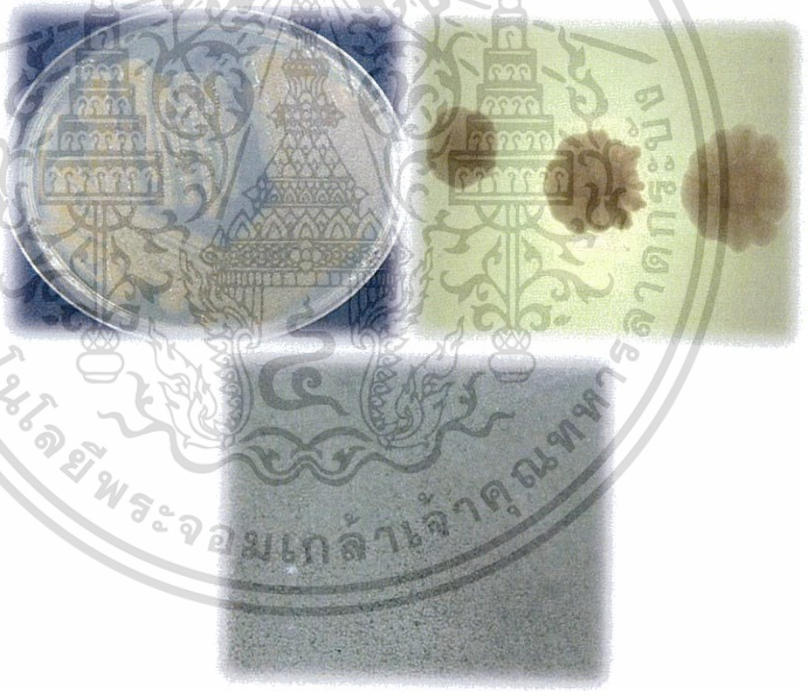
ตัวแทนกลุ่ม RT1-7

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีครีม สร้างเส้นใยอากาศสีขาวบนอาหาร ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ **และมี**สปอร์คู่เจริญอยู่ส่วนปลายของเส้นใยอากาศ

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 3 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลาย โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้



รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT1-7

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 RT2-1 และ RT2-2

ตัวแทนกลุ่ม RT2-2

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสีขาว ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นสายยาว

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 5 เปอร์เซ็นต์ เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลาย โปรตีน และ แป้งได้เล็กน้อย

รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-2

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 RT2-3,RT2-4 และ RT2-5

ตัวแทนกลุ่ม RT2-4

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์ เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลาย โปรตีน , เจลาติน และรีดิวซ์ไนเตรต ได้เล็กน้อย

รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-4

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 RT2-6

ตัวแทนกลุ่ม RT2-6

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , โปรตีน , เจลาติน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.6 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-6

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 RT2-7

ตัวแทนกลุ่ม RT2-7

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีครีม สร้างเส้นใยอากาศสีขาวบนอาหาร ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์คู่เจริญอยู่ส่วนปลายของเส้นใยอากาศ

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 3 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรต

รูปที่ 4.7 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-7

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 RT2-8 และ RT2-9

ตัวแทนกลุ่ม RT2-9

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , เจลาติน , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.8 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT2-9

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 RT3-1, RT3-2 และ RT3-3

ตัวแทนกลุ่ม RT3-1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีดำ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , เจลาติน , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.9 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT3-1

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 10 RT3-4

ตัวแทนกลุ่ม RT3-4

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีดำ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , เจลาติน , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.10 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT3-4

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 11 RT4-1 และ RT4-2

ตัวแทนกลุ่ม RT4-1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสีขาว ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ **และมี**สปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นสายยาว

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 4 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , โปรตีน และรีดิวซ์ไนเตรตได้เล็กน้อย

รูปที่ 4.11 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-1

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 12 RT4-3

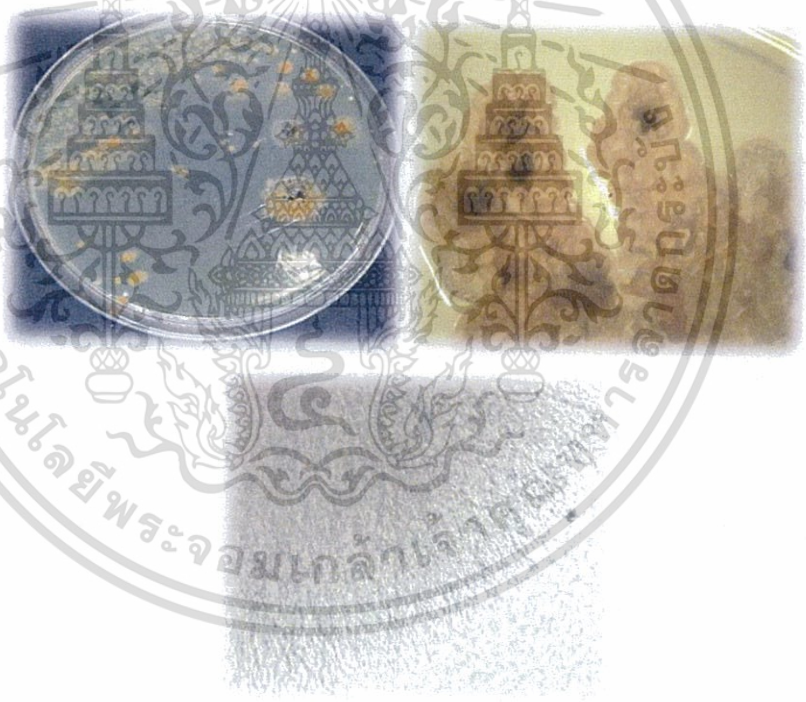
ตัวแทนกลุ่ม RT4-3

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , โปรตีน , เจลาติน และรีดิวซ์ไนเตรตได้



รูปที่ 4.12 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-3

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 13 RT4-4 และ RT4-5

ตัวแทนกลุ่ม RT4-4

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

สร้างเส้นใยอาหารสีดำ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงค์วัตถุละลายน้ำ และมีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายเส้นใยอาหาร

การทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เจริญบนอาหารที่มีเกลือได้สูงสุดร้อยละ 2 เปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถเจริญได้ที่ค่า pH 6-12 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง , โปรตีน , เจลาติน และรีดิวซ์ไนเตรตได้

รูปที่ 4.13 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต RT4-4

(ก และ ข) ลักษณะบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การศึกษาลักษณะเชื้อแอคติโนมัยสีททางจีโนไทป์

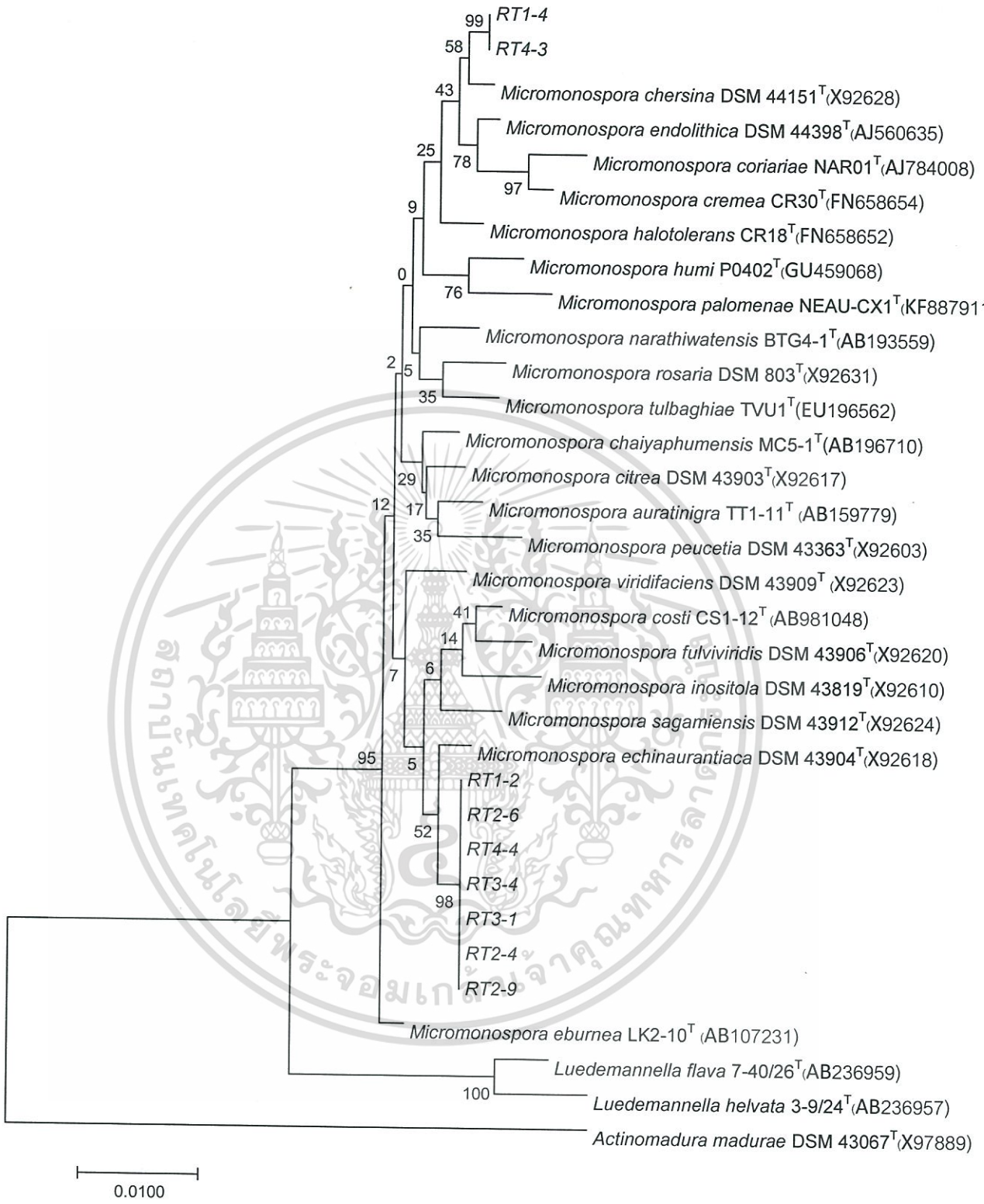
นำตัวแทนกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษาอนุกรมวิธาน โดยนำยีน 16S rRNA ไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล Eztaxon จากตัวแทนของเชื้อแอคติโนมัยสีท 13 กลุ่ม จะมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ 4 สายพันธุ์ คือ เชื้อ RT 1-7,RT 2-7 มีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 เชื้อ RT 1-4,RT 4-3 มีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora chersina* DSM 44151 เชื้อ RT 1-2,RT 2-4,RT 2-6,RT 2-9,RT 3-1,RT 3-4,RT 4-4 มีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora echinaurantiaca* DSM 43904 และเชื้อ RT 1-2,RT 2-4 มีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia kroppenstedtii* N1286

นำตัวแทนของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 13 กลุ่ม ไปทำการเปรียบเทียบวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เพื่อทำการเปรียบเทียบและสร้างเป็นแผนภาพ phylogenetic tree

สกุล *Micromonospora*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RT1-4 และ RT4-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora chersina* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.64 ทั้ง 2 ไอโซเลต ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 58 ไอโซเลต RT1-2,RT2-4,RT2-6,RT2-9,RT3-1,RT3-4 และ RT4-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora echinaurantiaca* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.43,99,50,99.50,99.50,99.58,99.58 และ 99.57 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 52 ตามแผนภาพที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT1-2 RT1-4 RT2-4 RT2-6 RT2-9 RT3-1 RT3-4 RT4-3 และ RT4-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกุล *Nocardia*

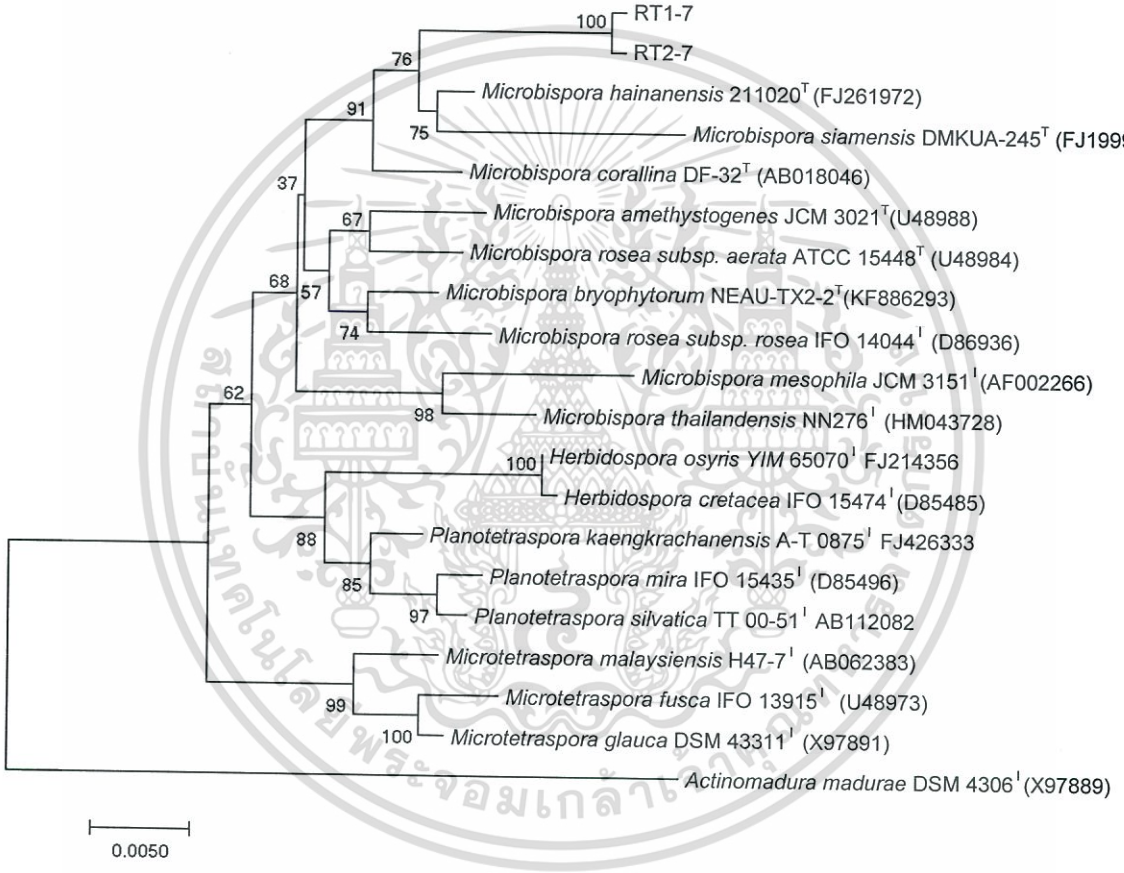
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RT2-2 และ RT4-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia kroppenstedtii* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.53 และ 99.58 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 100 ตามแผนภาพที่ 4.15

รูปที่ 4.15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT2-2 และ RT4-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกุล *Microbispora*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbipora hainanensis* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 98.52 และ 98.51 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 76 ตามแผนภาพที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

จะเห็นได้ว่าเชื้อ RT 1-7 และ RT 2-7 ที่มีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020 (ค่าความคล้ายคลึงอยู่ที่ 98.52% และ 98.51% ตามลำดับ) มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ จึงได้นำไปทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อในเรื่องความสามารถในการผลิตกรดและความสามารถในการใช้ฐานคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตกรด

นำเชื้อ RT 1-7 และ RT 2-7 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีฐานคาร์บอนไม่เหมือนกัน เพื่อดูความสามารถในการเปลี่ยนฐานคาร์บอนไปเป็นกรด โดยดูจากสีอาหารที่เปลี่ยนไป ได้ผลดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 4.2 แสดงการทดสอบความสามารถในการผลิตกรด

สกุล	รหัสเชื้อ	Acid production														
		Neg.	Glu	Ribose	Galactose	Sucrose	Mannital	Fructose	Arabinose	Lactose	Rhamnose	Raffinose	Cellobiose	Xylose	Salicin	Glycerol
Microbispora	RT 1-7	-	+	+	+	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	RT 2-7	-	+	+	+	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	-

4.1.4 การทดสอบความสามารถในการใช้ฐานคาร์บอน

นำเชื้อ RT 1-7 และ RT 2-7 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีฐานคาร์บอนไม่เหมือนกัน เพื่อดูความสามารถในการเจริญ โดยดูจากโคโลนีของเชื้อที่สามารถเจริญได้บนอาหาร ได้ผลดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 4.3 แสดงการทดสอบความสามารถในการใช้ฐานคาร์บอน

สกุล	รหัสเชื้อ	Media carbon utilize												
		Xylose	Galactose	Cellobiose	Salicin	Arabinose	Raffinose	Mannose	Fructose	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Glycerol	Mannital
Microbispora	RT 1-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RT 2-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.2 การอภิปรายผล

จากการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้ง 25 ไอโซเลตและนำมาทำการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมีเพื่อทำการคัดเลือกเชื้อออกเป็นกลุ่มๆ พบว่า เชื้อทั้ง 25 ไอโซเลตนั้นในการทดสอบทางสรีระวิทยามีความสามารถในการเจริญบนอาหาร ISP2 ที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน ส่วนการเจริญในอุณหภูมิต่างๆ และ การเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างนั้น เชื้อทุกตัวเจริญได้เหมือนกัน และการทดสอบทางชีวเคมีในการย่อยสลายเจลาติน, การใช้โปรตีนในนม, การรีดิวซ์ไนเตรท และการย่อยสลายแป้งนั้น เชื้อทุกไอโซเลตให้ผลที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อเพื่อนำมาศึกษาต่อ 13 ไอโซเลต พบว่าเชื้อไอโซเลต RT1-2,RT1-4,RT2-4,RT2-6,RT2-9,RT3-1,RT3-3,RT4-3 และRT4-4 นั้นไม่สร้างเส้นใยอากาศ มีสปอร์เดี่ยวเจริญอยู่ส่วนปลายของเส้นใยอาหาร โคโลนีเป็นสีส้ม ยกเว้น RT3-1 และ RT3-4 ที่โคโลนีเป็นสีดำ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบในระดับจีโนไทด์แล้วพบว่าเชื้อไอโซเลตกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่ม *Micromonospora* มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lei Li (2016) ในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางสรีระวิทยาและชีวเคมี เชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 นั้นสร้างเส้นใยอากาศ มีสปอร์คู่อยู่ปลายเส้นใยอากาศ เมื่อทำการเปรียบในระดับจีโนไทด์แล้วพบว่าทั้ง2ไอโซเลตจัดอยู่ในกลุ่ม *Microbispora* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiao Xu(2012) ในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการไม่สามารถใช้เจลาตินและแป้งได้ เชื้อไอโซเลต RT2-2 และ RT4-1 สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสีขาว มีสปอร์เป็นสายยาว เมื่อทำการเปรียบในระดับจีโนไทด์แล้วพบว่าเชื้อทั้ง2 ไอโซเลตจัดอยู่ในกลุ่ม *Nocardia* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Akiko(2004) ในด้านสัณฐานวิทยา และการเจริญบนอาหารที่มีความเข้นข้นของเกลือสูงสุดที่ 5 เปอเซ็นต์เกลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินบ่อและธารน้ำร้อนคลึง จังหวัดราชบุรี สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต โดยหลังจากพิจารณาจากค่าร้อยละความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene(%16 rRNA gene similarity) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากบ่อและธารน้ำร้อนจังหวัดราชบุรีจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ RT1-2 RT1-4 RT1-7 RT2-2 RT2-4 RT2-6 RT2-7 RT2-9 RT3-1 RT3-4 RT4-2 RT4-3 และ RT4-4 มีลักษณะที่โดดเด่นทางด้านอนุกรมวิธาน มาศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ พบว่าเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่จัดอยู่ใน 3 สกุล คือ *Microbispora Micromonospora* และ *Nocardia* ซึ่งเชื้อแต่ละสกุลมีลักษณะ ดังนี้

1.สกุล *Microbispora* เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนก้านชูสปอร์ที่สั้นบนส่วนของเส้นใยอากาศ จัดอยู่ในวงศ์ *Streptosporangiaceae* ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลตคือ RT1-7 และ RT2-7

2.สกุล *Micromonospora* เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ จัดอยู่ในวงศ์ *Micromonosporaceae* ประกอบด้วย เชื้อ 9 ไอโซเลต คือ RT1-2 RT1-4 RT2-4 RT2-6 RT2-9 RT3-1 RT3-4 RT4-3 และ RT4-4

3.สกุล *Nocardia* เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เป็นสายยาว จัดอยู่ในวงศ์ *Nocardiaceae* ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลตคือ RT2-2 และ RT4-1

จากการศึกษาข้างต้น พบว่าเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 มีค่าความคล้ายคลึง(similarity) ของลำดับเบสในช่วงยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง(type strain) สกุล *Microbispora* ในระดับต่ำจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จะเป็นสายพันธุ์ใหม่

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยพบว่าเชื้อไอโซเลต RT1-7 และ RT2-7 มีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากการทำอนุกรมวิธานเบื้องต้น จึงเหมาะแก่การนำไปศึกษาเพิ่มเติมในด้าน เคโมไทป์ การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การสร้างเอนไซม์ สารสี และในด้านการเกษตร ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นันทวัน เนียมหอม. 2555. "ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นประเทศไทย. "วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

El-Shatoury, S., Mitchell, J., Bahgat, M. and Dewedar, A. 2004. "Biodiversity of Actinomycetes in a constructed wetland for industrial effluent treatment." **Actinomycetologica.** 18 : 1-7.

Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology.** London : Academic Press.

Hayakawa, M., Nonomura, H. 1989. "A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil." **Actinomycetologica.** 3 : 95-104.

Hayakawa, M., Ariizumi, M., Yamazaki, T. and Nonomura, H. 1995b. "Chemotaxis in the zoosporic actinomycete *Catenuloplanes japonicus.*" **Actinomycetologica.** 9 : 152-163.

Hayakawa, M. 2003. "Selective isolation of rare actinomycete genera using pretreatment techniques." 55-74. in Kurtboke, I. **Selective Isolation of Rare Actinomycetes.** University of the Sunshine Coast, Faculty of Science. Queensland. Australia.

Hayakawa, M. 2008. "Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil." **Actinomycetologica.** 22 : 12-19.

Hayakawa, M., Yamamura, H., Sakuraki, Y., Ishida, Y., Hamada, M., Otoguro, M. and Tamura,T. 2010. "Diversity analysis of actinomycetes assemblages isolated from soils in cooltemperate and subtropical areas of Japan." **Actinomycetologica.** 24 : 1-11.

Kurtboke, I. 2003. "Use of bacteriophages for the selective isolation of rare actinomycetes." 9-46. in Kurtboke, I. **Selective Isolation of Rare Actinomycetes.** University of the Sunshine Coast, Faculty of Science. Queensland. Australia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nakaew, N., Pathom-aree, W. and Lumyong, S. 2009. "Generic diversity of rare actinomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds." **Actinomycetologica.** 23 : 21-26.

Nonomura, H. and Ohara, Y. 1974. "A new species of actinomycetes, *Thermomonospora mesouviformis* sp. nov." **Journal of Fermentation Technology.** 52 : 10-13.

Thawai, C. 2004. "Taxonomy of *Micromonospora* strains from Thai peat swamp forest soils and secondary matabolites of a selected isolate." Ph.D.Thesis of Chulalongkorn University.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. and Kudo, T. 2005. "*Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest." **Journal of Applied Microbiological.** 51 : 229-234.

Vobis, G. 1997. "Morphology of Actinomycetes." 180-191. in Miyadoh, S. **Atlas of Actinomycetes.** The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Zhang'Starch Soil Extract Agar(ZSSE)

soluble starch	5	กรัม
KNO_3	1	กรัม
Soil Extract	1	ลิตร
Agar	10	กรัม
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	0.025	กรัม
Nystatin(ละลายใน 100% DMSO)	0.05	กรัม

pH 7.2-7.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Sodium casein nitrate agar(SCN)

soluble starch	10	กรัม
casein	0.3	กรัม
KNO_3	2	กรัม
NaCl	2	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CaCO_3$	0.02	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Agar	18	กรัม
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	**0.025**	**กรัม**
Nystatin(ละลายใน 100% DMSO)	**0.05**	**กรัม**
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2-7.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Yeast extract - malt extract agar (ISP2)

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

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

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

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inorganic salts - starch agar (ISP4)

Soluble starch	10.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
$CaCO_3$	2.0	กรัม
Trace salts 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 salts 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	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม
L- asparagine	1.0	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Trace salts 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

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

Carbon utilization medium (ISP9)

Carbon sources

Carbohydrate	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptonization test medium

Solution A

Skim milk	5 กรัม
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Solution B

Agar	1 กรัม
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้สารละลายเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงนำ Solution A มาผสมกับ Solution B

Boullion gelatin broth

Peptone	1.0 กรัม
Meat extract	0.5 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
Gelatin	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone KNO_3 broth

Peptone	1.0 กรัม
KNO_3	0.1 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Basal inorganic nitrogen medium

Carbohydrate	10.0	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0

0.04% Bromocresol purple 15.0 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

สารที่ใช้การทำ DNA-DNA Hybridization

10xPBSM

$MgCl_2.7H_2O$	95 มิลลิกรัม
10xPBS	10 มิลลิลิตร

Pre-hybridization solution

20xSSC	1 มิลลิลิตร
50xDenhardt solution	1 มิลลิลิตร
Denaturated Salmon DNA (10 mg/ml)	0.1 มิลลิลิตร
Formamide	5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.9 มิลลิลิตร

Hybridization solution

น้ำกลั่น	2.8 มิลลิลิตร
Dextran sulfate	0.25 กรัม
20xSSC	1 มิลลิลิตร
50xDenhardt solution	1 มิลลิลิตร
Denaturated Salmon DNA (10mg/ml)	0.1 มิลลิลิตร
Formamide	5 มิลลิลิตร

Solution I

BSA	0.25 กรัม
Triton-X-100	50 ไมโครลิตร
1X PBS	50 มิลลิลิตร

Solution II

Streptavidin POD	1 ไมโครลิตร
Solution I	4 มิลลิลิตร

Solution III

TMB (10 mg/ml in DMFO)	100 ไมโครลิตร
0.3% H2O2	100 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.1M Citric acid in 10% DMFO	
+ 0.2 M Na2HPO4 bufffer pH 6.2	5 มิลลิลิตร

<u>100x denhardt solution</u>

Bovine serum albumin (fraction V)	2 กรัม
Polyvinylpyrolidone	2 กรัม
Ficoll 400	2 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

<u>2xPBS</u>

8 mM Na_2HPO_4	1.15 กรัม
1.5 mM KH_2PO_4	0.2 กรัม
137 mM NaCl	8.0 กรัม
2.7 mM KCl	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

รหัสเชื้อ	ISP3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7
RT1-2	Strong Brown	Strong Brown	Black	-	Black
RT1-4	Light Brown	Strong Brown	Light Gray	-	Light Brown
RT1-7	Pale Yellow	-	Pale Yellow	Light Brown	Pale Yellow
RT2-2	White	White	Light Brown	Pale Yellow	Strong Orange
RT2-4	Vivid Orange	-	-	-	Light Brown
RT2-6	Vivid Orange	Vivid Orange	Light Gray	Strong Brown	Light Brown
RT2-7	Pale Yellow	-	Pale Yellow	Light Brown	Pale Yellow
RT2-9	Strong Brown	Vivid Orange	Pale Yellow	-	-
RT3-1	Black	Black	Black	-	Black
RT3-4	Black	Black	-	-	-
RT4-1	Pale Yellow	White	White	Pale Yellow	White
RT4-3	Vivid Orange	Vivid Orange	Light Gray	-	White
RT4-4	Light Brown	Light Brown	Pale Yellow	-	White

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The NBS/IBCC Color System

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
Reddish Orange, Reddish Brown			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43	
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D	
41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005	
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651	
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26	
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011	
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57	
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830	
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931
Yellowish Green		
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 7.7	#2A8D9C
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027
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	#6C92AE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	#AE848B
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116
Reddish Purple		
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT1-2

GTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
AATAGGACCACTGGTCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT
TGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGAT
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCT
AGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGG
GGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT1-4

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTGGCCT
CGCATGAGGTTTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTAC
CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACTGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCC
TCTCCGGTTCCCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACAT
GGCCGCAAAACTCGCAGAGATGTGAGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCATCGAAGA
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAGGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
CAATGGCCGG

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT1-7

GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCG
GATATGACACATGGCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTGTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTG
GTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGG
ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTG
TCGCGTCTGCCGTGAAAGCTCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTGGAGGCTGGTAGGGGCAAG
TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTC
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAG
GTGTGGGGGTCTTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA
AGGCTTGACATGCACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCCCTCCTTTTGGACTGGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCATGCCCGTTTGGG
TGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGT
CTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGGCGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGT
CTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCTAACC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT2-2

GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACAC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGTACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCG
GATATGACCTTACATCGCATGGTGTTTGGTGGAAAGATTTATCGGTACAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCGTCCGTGAAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGA
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAA
CTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTA
GGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGCGTTATGGCGG
GGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT2-4

GTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
AATAGGACCACTGGTCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT
TGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGAT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCT
AGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGG
GGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT2-6

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCACTGGT
CGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTAC
CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACTGT
GAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCC
TCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACAT
GGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGA
CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
CAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCT
GCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT2-7

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGACA
CATGGCCGCATGGTCTGTGTGTGGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGA
TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCC
TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTG
CCGTGAAAGCTCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATAGCGGGCAGGCTGGAGGCTGGTAGGGGCAAGTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTCTGACGATG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGG
GTCTTCCACGATTCCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
CATGCACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCCCTCCTTTTGGACTGGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCATGCCCGTTTGGGTGGTGGGG
ACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCT
GCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGGCGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTC
GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCTAAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT2-9

GTTTGATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
AATAGGACCACTGGTCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT
TGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGAT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCT
AGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGG
GGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT3-1

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCA
CTGGTCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGG
CCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCG
ACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGG
GGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTG
ACATGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCG
AAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCAT
GCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGG
GTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT3-4

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCACTG
GTCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACT
GTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGC
CTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA
TGGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAG
ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCT
ACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTC
TGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT4-1

GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACAC
GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGTACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCG
GATATGACCTTACATCGCATGGTGTTTGGTGGAAAGATTTATCGGTACAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
GGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCGTCCGTGAAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGA
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAA
CTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTTGCCAGCGCGTTATGGCGG
GGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGG
CTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGT
TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT4-3

CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTGGC
CTCGCATGAGGTTTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACT
GTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGC
CTCTCCGGTTCCCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA
TGGCCGCAAAACTCGCAGAGATGTGAGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCATCGAAG
ACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAGGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCT
ACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTC
TGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16s rRNA ของเชื้อไอโซเลต RT4-4

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGG

TGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCACTGG

TCGCATGTCCGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTA

CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG

AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT

GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCC

GCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACTGT

GAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT

GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA

GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCC

TCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGA

ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACAT

GGCCGCAAAACCGGCAGAGATGTCGGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG

AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGA

CTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA

CAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCT

GCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT

ACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้