

อนุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทหายาก  
ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

TAXONOMY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF RARE ACTINOMYCETES  
IN MAEWONG NATIONAL PARK

สุทามาส ฉีรพงษ์พร  
SUTHAMAT CHIARAPHONGPHON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KUWL-2009-SC-M-020-049

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อนุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีทหายาก  
ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

TAXONOMY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF RARE ACTINOMYCETES  
IN MAEWONG NATIONAL PARK



สุทามาส เจียรพงษ์พร

SUTHAMAT CHIARAPHONGPHON

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 105488  
วัน,เดือน,ปี..... 24 พ.ย. 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ.2552

KMITL-2009-SC-M-020-049

**TAXONOMY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF RARE ACTINOMYCETES  
IN MAEWONG NATIONAL PARK**

**SUTHAMAT CHIARAPHONGPHON**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2009**

**KMITL-2009-SC-M-020-049**

**COPYRIGHT 2009**

**FACTULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์      อนุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทหายากในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์  
Taxonomy and Biological Activities of Rare Actinomycetes in Maewong National Park  
นักศึกษา                      นางสาวสุทามาส เจียรพงษ์พร  
รหัสประจำตัว                49068302  
ปริญญา                        วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา                    เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์      ดร.จิตติ ท่าไฉ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	พนา โลหะทรัพย์ทวี
ดร.จิตติ	ท่าไฉ	จิตติ ท่าไฉ
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
รศ.ดร.สมบูรณ์	ธนาศุภวัฒน์	สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 19 ตุลาคม 2552 เวลา 13.00 – 16.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามณเฑียรวิทยาลัย 1 ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุชิต จารุวนาวัฒน์)

รักษาการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.  
วันที่ส่งกลับ วิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์  
วันที่ 30 เดือน ๑๑.๑ พ.ศ. ๕๒  
ลงชื่อ.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อนุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทหายาก ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
นักศึกษา	นางสาวสุทามาส เจียรพงษ์พร
รหัสประจำตัว	49068302
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.จิตติ ท่าไฉ

### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีชนิดไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกแบบ *meso* จำนวน 72 สายพันธุ์ และแบบ *LL* จำนวน 3 สายพันธุ์ แยกจากดินที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย เชื้อเหล่านี้ถูกจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น 19 กลุ่ม ลักษณะทั่วไปของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกกำหนดโดยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์ห้วงควานวิวัฒนาการด้วยลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่าเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Catellatospora*, *Dactylosporangium*, *Herbidospora*, *Kribbella* (*LL-DAP*), *Micromonospora*, *Planotetraspora*, *Pseudonocardia*, *Nocardia*, *Nonomuraea* และ *Streptosporangium* ในการศึกษาพบเชื้อสายพันธุ์ MW2-25 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีทั่วไปเหมือนกับเชื้อสกุล *Dactylosporangium* แต่มีลักษณะทางจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ที่แตกต่างจากสมาชิกของเชื้อสกุล *Dactylosporangium* ทั้งหมด ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์ MW 2-25 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Dactylosporangium* โดยกำหนดชื่อว่า *Dactylosporangium maewongense*

น้ำหมักของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอลและถูกประเมินค่ากิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยเทคนิค Disk diffusion พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 11 และ 14 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ สำหรับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระถูกตัดสินด้วยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยใช้สารเคอร์เซทินเป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอลของเชื้อสายพันธุ์ MW 3-11 แสดงกิจกรรมการดักจับอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดที่ระดับ  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.26 \pm 0.05 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารเคอร์เซทินแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.34 \pm 0.3 \times 10^{-4}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อตัวแทนทุกกลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ african green monkey kidney fibroblast ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

<b>Thesis Title</b>	Taxonomy and biological activities of rare actinomycetes in Maewong National Park
<b>Student</b>	Ms. Suthamat Chiaraphongphon
<b>Student ID.</b>	49068302
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Programme</b>	Biotechnology
<b>Year</b>	2009
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Chitti Thawai

### ABSTRACT

Seventy two *meso*-diaminopimelic acid and three *LL*-diaminopimelic acid containing actinomycete strains were isolated from soils collected in Mae-Wong National Park, Nakhonsawan, Thailand. These strains were grouped by using phenotypic characteristic into 19 groups. The generic identities of these representative strains in each group were determined by using a procedure that combined morphological, chemotaxonomic and 16S rDNA sequence-based phylogenetic analyses. Actinomycetes belonging to a total of ten genera, *Catellatospora*, *Dactylosporangium*, *Herbidospora*, *Kribbella*, *Micromonospora*, *Planotetraspora*, *Pseudonocardia*, *Nocardia*, *Nonomuraea* and *Streptosporangium* were identified. Here, we found the strain MW2-25 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genus *Dactylosporangium* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Dactylosporangium* species. Therefore, the strain MW2-25 was judged to represent a novel species of the genus *Dactylosporangium*, for which the name *Dactylosporangium maewongense* was proposed. The fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and n-butanol. Disk diffusion technique was preliminary used to evaluate for the antimicrobial activities. Susceptibility test by disk diffusion method revealed that the strains in Group 11 and 14 could inhibit the growth of test microorganisms, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The antioxidant activity was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. Quercetin was used as reference standard. The results showed that the crude n-butanol extract of strain MW3-11 exhibited the best of free radical scavenging activity as evidenced by the low  $IC_{50}$  values ( $1.26 \pm 0.05 \times 10^{-3}$  mg/ml) while the quercetin showed the antioxidant activity with the  $IC_{50}$  value at  $3.34 \pm 0.3 \times 10^{-4}$  mg/ml. Furthermore, the crude extracts of all representative strains showed no cytotoxic effect on african green monkey kidney fibroblast cell at concentration of 1 mg/ml.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาจาก ดร. จิตติ ท่าไว ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้ารู้สึกทราบบ้างในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ณ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สอนเทคนิคต่างๆ ในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนเครื่องมือ ตลอดจนข้อมูล ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ครอบครัวและมิตรสหายของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุทามาส เจียรพงษ์พร

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารตาราง.....	VIII
สารรูป.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท (actinomycetes).....	3
2.2 แอกติโนมัยซีทในธรรมชาติ.....	5
2.3 การคัดแยกแอกติโนมัยซีท.....	5
2.4 จัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีท.....	8
2.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics).....	8
2.4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	8
2.4.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา.....	9
2.4.2 ลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบภายในเซลล์ (chemotaxonomic characteristics).....	12
2.4.2.1 ลักษณะของผนังเซลล์ที่มีกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid, DAP).....	12
2.4.2.2 ลักษณะน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar).....	12
2.4.2.3 ลักษณะของโพลาร์ลิพิด (polar lipid).....	13
2.4.2.4 ลักษณะไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones).....	14
2.4.2.5 กรดมัคคอลลิก (mycolic acid).....	14
2.4.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics).....	15
2.4.3.1 เทคนิค polymerase chain reaction (PCR).....	16
2.4.3.2 อะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis).....	17

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3.3 การศึกษาส่วนประกอบของเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content).....	17
2.4.3.4 ค่า melting temperature (Tm).....	17
2.4.3.5 การทำไฮบริดไคเซชัน (DNA-DNA Hybridization).....	18
2.4.4 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีท.....	19
2.5 ประโยชน์ของกลุ่มแอกติโนมัยซีท.....	26
2.6 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ .....	31
2.6.1 ที่ตั้งและอาณาเขต.....	31
2.6.2 สภาพภูมิประเทศ.....	31
2.6.3 สภาพภูมิอากาศ.....	31
2.6.4 ลักษณะผืนป่าและพืชพรรณ.....	31
บทที่3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	34
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	34
3.2 สารเคมี.....	34
3.3 จุลินทรีย์.....	36
3.4 ตัวอย่างที่ใช้คัดแยกแอกติโนมัยซีทหายาก.....	36
3.5 วิธีการเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อ.....	36
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างโดยการผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air-drying treatment).....	36
3.5.2 การเตรียมตัวอย่างโดยการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ100องศาเซลเซียส (dried-heat treatment).....	37
3.5.3 การเตรียมตัวอย่างโดยการต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ70องศาเซลเซียส (moist-heat treatment).....	37
3.5.4 การเตรียมตัวอย่างโดยการใช้สารละลายฟีนอล (phenol treatment) .....	37
3.6 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทหายาก.....	38
3.7 วิธีการเก็บรักษาเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยการแช่แข็ง (freezing).....	38
3.8 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีท.....	38
3.8.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์.....	38
3.8.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ.....	38
3.8.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท.....	39
3.8.1.3 การศึกษาลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี.....	39

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีภายในเซลล์.....	41
3.9.1 การเตรียมเซลล์.....	41
3.9.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์(diaminopimelic acid, DAP) .....	41
3.9.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole-cell sugar).....	40
3.9.4 การวิเคราะห์ polar lipid.....	40
3.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น.....	43
3.11 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition).....	43
3.11.1 การแยก DNAและทำให้บริสุทธิ์.....	43
3.12 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene บนสายดีเอ็นเอและ การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ.....	44
3.12.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR).....	44
3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene บนสายดีเอ็นเอ.....	45
3.12.3 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis).....	45
3.13 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทอย่างละเอียด.....	46
3.13.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีเพิ่มเติม.....	46
3.13.1.1 การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone).....	46
3.13.1.2. การวิเคราะห์เอซิลไทป์ (acyl type).....	46
3.13.1.3. การวิเคราะห์กรดมัคคอลลิก (mycolic acid).....	46
3.13.1.4. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid).....	47
3.13.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนไทป์เพิ่มเติม.....	47
3.13.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content).....	47
3.13.2.2 การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดไนเซชัน (DNA-DNA hybridization).....	47
3.14 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity).....	49
3.14.1 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ.....	49
3.14.2 การสกัดสาร.....	49
3.14.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity).....	49
3.14.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH scavenging method.....	50
3.14.4.1 เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical หรือ DPPH radical scavenging .....	50

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.14.4.2 การทดสอบการทำปฏิกิริยา.....	50
3.14.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์.....	51
3.15 สถานที่ทำการทดลอง.....	51
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	52
4.1 ผลการแยกและคัดเลือกรเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก.....	52
4.2 ผลการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท.....	52
4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์.....	52
4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของเซลล์.....	81
4.2.2.1 การวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมลิกในผนังเซลล์.....	81
4.2.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell sugar).....	82
4.2.2.3 การวิเคราะห์ polar lipid.....	83
4.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนในแต่ละกลุ่ม.....	88
4.3 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของสารสกัด หายาจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้.....	106
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH scavenging .....	106
4.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์.....	108
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	109
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	110
เอกสารอ้างอิง.....	113
ภาคผนวก ก.....	118
ภาคผนวก ข.....	126
ภาคผนวก ค.....	133
ภาคผนวก ง.....	174
ภาคผนวก จ.....	182
ภาคผนวก ฉ.....	192
ภาคผนวก ช.....	193
ภาคผนวก ซ.....	202

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์และจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้.....	28
2.2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอสคิโนมัซีทาฮายาก.....	29
4.1 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัซีทาฮายากกลุ่มต่างๆ.....	72
4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอสคิโนมัซีทาฮายากกลุ่มต่างๆ.....	78
4.3 ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมติกในผนังเซลล์ของเชื้อ.....	81
4.4 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole cell sugar).....	82
4.5 แสดงองค์ประกอบของโพลาร์ลิพิด (polar lipid) จากเชื้อตัวแทนกลุ่มแต่ละกลุ่ม.....	83
4.6 ลักษณะความแตกต่างของเชื้อแอสคิโนมัซีทสายพันธุ์ MW2-25 <sup>T</sup> และ MW4-36 กับเชื้อมาตรฐาน (type strain) ของสกุล <i>Dactylosporangium</i> .....	104
4.7 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต MW2-25, MW4-36 และเชื้อสายพันธุ์ มาตรฐาน (type strain) ของสกุล <i>Dactylosporangium</i> .....	105
4.8 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของเชื้อแอสคิโนมัซีทไอโซเลต MW2-25 <sup>T</sup> และ MW4-36.....	105
4.9 ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรและค่าร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอล.....	107

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ.....	14
2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคติโนแบคทีเรีย.....	19
2.3 โครงสร้างของสารประกอบที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก.....	30
2.4 แผนที่บริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ .....	33
4.1 แสดงจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากการเตรียมตัวอย่างดิน 4 วิธี.....	52
4.2 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่1.....	53
4.3 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่2.....	54
4.4 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่3.....	55
4.5 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่4.....	56
4.6 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่5.....	57
4.7 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่6.....	58
4.8 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่7.....	59
4.9 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่8.....	60
4.10 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่9.....	61
4.11 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่10.....	62
4.12 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่11.....	63
4.13 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่12.....	64
4.14 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่13.....	65
4.15 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่14.....	66
4.16 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่15.....	64
4.17 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่16.....	68
4.18 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่17.....	69
4.19 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่18.....	70
4.20 แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ของกลุ่มที่19.....	71
4.21 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW8-21 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method).....	92
4.22 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW4-35 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method).....	93
4.23 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW2-5, MW10-13, MW10-12, MW12-5 และ MW13-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method).....	94
4.24 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW2-25 และ MW4-36 บน phylogenetic tree (neighbor- joining method).....	95

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
4.25 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW5-25 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method).....	96
4.26 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW3-11, MW5-16 และMW7-20 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method).....	97
4.27 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW3-17 และ MW7-23 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method).....	98
4.28 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW10-11 phylogenetic tree (Neighbor-Joining method).....	99
4.29 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW12-18 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method).....	100
4.30 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW2-22 และMW1-15 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method) .....	101
4.31 ร้อยละของการดักจับอนุภาคนิวเคลียสของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอลของเชื้อรหัสMW3-11 เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทินในตัวอย่างผสมของเมทานอลและDMSO (อัตราส่วน 1:1).....	107
4.32 ร้อยละของการดักจับอนุภาคนิวเคลียสของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอลของเชื้อรหัสMW3-17 เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทินในตัวอย่างผสมของเมทานอล และDMSO (อัตราส่วน 1:1).....	108

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของงานวิจัย

เชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นแหล่งของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จุลินทรีย์เหล่านี้มีกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolites) ที่หลากหลายเป็นแหล่งของสารประกอบใหม่ๆ ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นยาและผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่างๆ ได้มากมาย จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางพาณิชย์และการแพทย์ ดังนั้น แอกติโนมัยซีทจึงเป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่น่าสนใจในการหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือยา เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีโครงสร้างแปลกใหม่มักจะมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายได้เช่นกัน จากข้อมูลพบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 45 ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดคือเชื้อสกุลสเตรปโตไมซีส (*Streptomyces*) ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ร้อยละ 80.2 ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) ผลิตได้ร้อยละ 6 นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น (Berdy, 2005) จากข้อมูลทำให้ทราบว่า การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุลอื่นๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับเชื้อสกุลสเตรปโตไมซีส ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสกุลสเตรปโตไมซีสเป็นเชื้อที่พบได้ในดินทั่วไปและมีการกระจายตัว มากที่สุดในกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด ซึ่งในดินที่เป็นป่าธรรมชาติจะพบว่ามีเชื้อสกุลสเตรปโตไมซีสอยู่จำนวนมาก (Goodfellow and Simpson, 1987) ส่วนในกลุ่มที่เรียกว่าแอกติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) หรือ non *Streptomyces* เป็นเชื้อที่ยังมีการศึกษาในด้านอนุกรมวิธานและการประยุกต์ใช้ไม่มากนัก อีกทั้งเชื้อกลุ่มนี้ยังมีความหลากหลายทางด้านนิเวศน์วิทยาค่อนข้างสูง

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเน้นค้นหาเชื้อแอกติโนมัยซีทในสกุลอื่นที่นอกเหนือจากสกุลสเตรปโตไมซีสจากแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่เพื่อทำการจัดจำแนกชนิดเชื้อร่วมกับศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่พบในดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งในประเทศไทย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากดินตัวอย่างที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่वंก
- 1.2.2 เพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่แยกได้
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากเหล่านั้น

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากตัวอย่างดินที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่वंก จังหวัดนครสวรรค์ จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อที่แยกได้ในระดับสกุลและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความน่าสนใจมาพิสูจน์เอกลักษณ์จนถึงระดับสปีชีส์ (species) รวมถึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกในอาหารและทำการสกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้จะสามารถรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่वंก จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งอาจค้นพบเชื้อที่มีความน่าสนใจที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี และ/หรืออาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งล้วนแต่มีประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท (actinomycetes)

“แอกติโนมัยซีท” มาจากภาษากรีก คำว่า “aktis” แปลว่ารังสี ซึ่งรวมกับคำว่า “mykes” ที่แปลว่าเชื้อราอันเนื่องมาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏให้เห็น แอกติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอสูง จัดอยู่ในอันดับแอกติโนมัยซีทาเลส (Order Actinomycetales) มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างราและแบคทีเรีย แต่เชื้อชนิดนี้ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจึงจัดเป็นโพรคาริโอต (prokaryote)

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่เจริญเป็นเส้นใยแตกกิ่งก้านมักอาศัยอยู่ในดินเป็นส่วนใหญ่ ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Schlegel, 1997) และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ผลิตสปอร์แบบเดี่ยว คู่ หรือสายโซ่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ซึ่งอยู่บนเส้นใยอากาศ (Coyne, 1999)

แอกติโนมัยซีทประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า apical region และ intercalary region สร้างผนังกันเส้นใยแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ การแตกสาขาของเส้นใยเป็นแบบ โมโนโพเดียล (monopodial) ซึ่งพบได้บ่อยที่สุด ส่วนใหญ่พบในสกุลสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces*) แบบไดโคโตมัส บรานซ์ (dichotomous branch) พบในสกุลแอกติโนบิฟิดา (*Actinobifida*) และแบบเวอร์ติซิลเลท (verticillate) พบในสกุลสเตรปโตเวอร์ติซิลเลียม (*Streptoverticillium*) แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือเส้นใยอาหาร หรือ primary (substrate) mycelium และเส้นใยอากาศ หรือ secondary (aerial) mycelium ในสกุลสเตรปโตมัยซีส เส้นใยอากาศมีลักษณะต่างจากเส้นใยอาหารอย่างชัดเจนคือ เส้นใยอากาศจะมีลักษณะของเส้นใยที่บางกว่าเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศมักจะมีสีเข้มสร้างรงควัตถุที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble pigment) รวมทั้งที่ผนังหุ้มชั้นนอกปรากฏเป็นสีเทาเมื่อมีการสะท้อนแสง มีการแตกสาขา (branching) น้อยกว่าเส้นใยอาหาร ลักษณะของเส้นใยอากาศส่วนใหญ่จะไม่มีการเจริญแบบแทงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์และการแตกหักเป็นท่อน (fragmentation) ของเส้นใย

ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะต่างกันคือ การเจริญในอาหารเหลวเซลล์จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่าเพลเลตส์ (pellets) แต่สำหรับเชื้อบางชนิด เช่น *Nocardia corallina* เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีการเขย่าให้อากาศเชื้อจะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod) มีการแบ่งเซลล์แบบไบนารีฟิชชัน (binary fission) และแบบแตกหักเป็นท่อน (fragmentation) เมื่อหยุดการเจริญ ในขณะที่การเจริญบนอาหารแข็งซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารเช่นเดียวกับในอาหารเหลวเชื้อเจริญแบบสร้างเส้น

ใย (filamentous form) ในลักษณะที่ยึดติดแน่นกับผิวหนังอาหารวุ้น และมีการแตกหักเป็นท่อนของเส้นใยเมื่อมีอายุมากขึ้น โดยทั่วไปลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ สามารถพบได้ 3 แบบคือ

ก. โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหนังอาหารอย่างหลวมๆ เป็นการสร้างเส้นใยอากาศปกคลุมผิวหนังอาหาร มักพบในแอสคิโนมัยซีทที่มีการเจริญในระยะ transient mycelial มีการเจริญของเส้นใยที่ไม่แน่นอน

ข. โคโลนีไม่มีเส้นใยอากาศแต่มีเส้นใยอาหารที่ยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนที่ยึดเกาะพิเศษที่เรียกว่าโฮลด์ฟาสต์ (holdfast)

ค. โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนัง เส้นใยอากาศค่อนข้างโป่งและยึดกับอาหารด้วยเส้นใยที่แทงลงไปในการ โดยเส้นใยที่อยู่เหนืออาหารเรียกว่าเส้นใยอากาศและเส้นใยที่อยู่ภายใต้อาหารเรียกว่าเส้นใยอาหาร สำหรับในอาหารเหลวเรียกเส้นใยที่อยู่บนผิวอาหารว่า generative mycelium และเส้นใยที่อยู่ในอาหารว่า vegetative mycelium

การเจริญของเชื้อกลุ่มแอสคิโนมัยซีทมักเจริญโดยสร้างเส้นใยแตกกิ่งก้านให้เห็นได้บนผิวหนังของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์หลังจากทำการบ่มเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจะปรากฏให้เห็นโคโลนีหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 3-4 วัน แต่เส้นใยและสปอร์จะพัฒนาเต็มที่ เมื่อเวลาผ่านไป 7-14 วัน บางสายพันธุ์ที่มีการเจริญช้าอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน โคโลนีของแอสคิโนมัยซีทจะมีลักษณะที่จำเพาะและแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้โดยการแบ่งตัวของเส้นใยจะทำให้เกิดกลุ่มของเส้นใยที่แทงผ่านลงไปในการเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) และเส้นใยที่แบ่งตัวแตกกิ่งก้านทับซ้อนซ้ำๆ กันขึ้นไปบนผิวหนังของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเส้นใยที่ยึดกันแน่นหนาทำให้เกิดเป็นโคโลนีที่มีลักษณะเหนียวชั้นมองดูคล้ายแผ่นหนัง (Williams และคณะ, 1989)

แอสคิโนมัยซีทมีช่วงการเจริญที่ยาวนานกว่าราและแบคทีเรีย เมื่อสารอาหารมีสูง ระดับการแข่งขันในการใช้อาหารมีมาก เชื้อแอสคิโนมัยซีทจะมีปริมาณน้อยลงและเมื่อมีสารอาหารจำกัดและระดับการแข่งขันน้อยลงเชื้อแอสคิโนมัยซีทจะมีปริมาณสูงขึ้น ลักษณะโคโลนีของแอสคิโนมัยซีทแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น โดยส่วนใหญ่จะเจริญในอาหารแข็งโดยแทงเส้นใยลงในวุ้น ผิวหนังของโคโลนีมีลักษณะแห้ง บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารสีที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) (Miyadoh, 1997)

แอสคิโนมัยซีทสามารถทนต่อสภาวะเป็นด่างได้ดีโดยพบว่าในดินที่เป็นด่าง จุลินทรีย์ที่แยกได้มักเป็นแอสคิโนมัยซีทถึงร้อยละ 95 แต่ในทางกลับกันแอสคิโนมัยซีทไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและอาจเหลือเพียงร้อยละ 1 เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 5 คุณสมบัติที่ไม่ทนกรดถูกนำมาใช้ควบคุมแอสคิโนมัยซีทที่เป็นพาหะนำโรค เช่น สามารถควบคุมโรค potato scab ที่เกิดจาก *Streptomyces scabies* โดยปรับดินให้มีความเป็นกรด แอสคิโนมัยซีทเป็นพวกที่อาศัยการ

ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์เป็นแหล่งพลังงาน (saprophytes) ดังนั้นเมื่ออินทรีย์สารเพิ่มจำนวนขึ้น จำนวนของแอกติโนมัยซีทก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

แอกติโนมัยซีทไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระเจริญอยู่บนอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อย บางชนิดเป็นพาหะนำโรคมารู่มนุษย์ เช่น *Mycobacterium leprae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อนและ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรควัณโรค แอกติโนมัยซีทอื่นๆ เป็นพาหะนำโรคของสัตว์และพืช แต่แอกติโนมัยซีทที่พบในดินมักไม่เป็นอันตราย บางชนิดมีประโยชน์ เช่น แอกติโนมัยซีทในสกุลแฟรนเกีย (*Frankia*) จะอยู่ร่วมกับพุ่มไม้และต้นไม้ใหญ่มีส่วนช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Coyne, 1999)

## 2.2 แอกติโนมัยซีทในธรรมชาติ

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอกติโนมัยซีท นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนของลิคของหน้าดิน โดยดินที่มีซากพืชซากสัตว์เป็นองค์ประกอบ 1 กรัมจะมีประชากรของแอกติโนมัยซีทมากกว่า 1 ล้านไอโซเลต ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัยซีท ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Williams *et al.*, 1983) แอกติโนมัยซีทเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในดิน โดยเชื้อเหล่านี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้จากการนำสารอาหารที่มีอยู่ในดินมาใช้ โดยปกติเชื้อแอกติโนมัยซีทจะไม่สร้างสปอร์แต่จะสร้างเมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ นอกเหนือจากเชื้อแอกติโนมัยซีทแล้วยังมีเชื้อชนิดอื่นอีกที่อยู่ในดินประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรโพรทิสตา (protista) โดยเชื้อทั้งหลายเหล่านี้มีประโยชน์ต่อความสมดุลของระบบนิเวศน์เนื่องจากในดินมีเชื้ออยู่หลายชนิด การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจึงจำเป็นต้องทำการกำจัดเชื้อชนิดอื่นออกก่อน

## 2.3 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา และคณะ (2546) ทำการตรวจนับแอกติโนมัยซีทในดินจากป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง บริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร humic acid vitamins agar ที่เติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวน non-streptomycete จำนวน  $17.6 \times 10^4$  ถึง  $36 \times 10^4$  CFU ต่อดินหนึ่งกรัม และจำนวน  $20.5 \times 10^4$  ถึง  $42 \times 10^4$  CFU ต่อดินหนึ่งกรัม ตามลำดับ สามารถจัดจำแนกได้ 10 สกุล คือ *Nocardia* 74 ไอโซเลต *Micromonospora* 46 ไอโซเลต *Actinoplanes* 22 ไอโซเลต *Saccharomonospora* 8 ไอโซเลต *Microtetraspora* 6 ไอโซเลต *Streptosporangium* 9 ไอโซเลต *Actinomadura* 6 ไอโซเลต

*Saccharopolyspora* 2 ไอโซเลต *Microbispora* 2 ไอโซเลต และไม่สามารถจำแนกสกุลได้ 32 ไอโซเลต จำนวนแอกติโนมัยซีทที่แยกได้หลายสกุลนี้ชี้ให้เห็นว่าพื้นที่ในป่าเบญจพรรณ และในป่าเต็งรัง บริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ

วรารักษ์ บัลลังก์นาค และคณะ (2550) แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 12 แหล่งบนอาหาร Actinomycetes Isolation agar (AIA) ได้ทั้งหมด 71 ไอโซเลต ผลการทดสอบสามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ที่คือยา พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีท จำนวน 22 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ 11 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

Miyadoh (1997) ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยวิธี การตากตัวอย่างให้แห้ง (drying treatment) การให้ความร้อนแห้ง (dry-heat treatment) และการใช้สารเคมี (chemical treatment) โดยการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างจำเป็นต้องตากตัวอย่างดินให้แห้งเพื่อเป็นการกำจัดแบคทีเรียเบื้องต้นและมีการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารคัดแยกเชื้อเพื่อเป็นการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ อาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อเป็นอาหารเฉพาะ เช่น humic acid-vitamin agar

Suzuki (2001) อธิบายว่าสปอร์ของเชื้อสกุลแอกติโนไบสปอรา (*Actinobispora*) สามารถทนต่ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีความสามารถในการทนทานสารปฏิชีวนะ ลิวโคไมซิน (leucomycin) และโนโวไบโอซิน (novobiocin) ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เช่นเดียวกับที่สามารถทนทานต่อทูนิกามัยซิน (tunicamycin) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมได้ ในขณะที่เชื้อสกุลสเตรปโตมัยซีสอ่อนแอต่อสารปฏิชีวนะนี้ จากการคัดแยกเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถคัดแยกเชื้อสกุลแอกติโนไบสปอราได้ 105 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 574 ตัวอย่าง ที่เก็บจากประเทศต่างๆ 23 ประเทศ

Matsumoto และคณะ (2003) กล่าวว่า การใช้ผงเจล gellan gum ในอาหารคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท จะทำให้พบเชื้อสกุล *Actinobispora* ที่สามารถผลิตสารแอกติโนไฮวิน (actinohivin) ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่สามารถต่อต้านเชื้อ HIV (human immunodeficiency virus) ได้

Takahashi และ Omura (2003) พบว่าจากการเก็บตัวอย่างดินที่อุณหภูมิบริเวณสภาพแวดล้อมนั้นๆ เช่น ฟาร์มปศุสัตว์ สวน หรือบริเวณป่า จะสามารถคาดคะเนจำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ตามสิ่งแวดล้อมหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีการเก็บตัวอย่างดิน และเชื่อว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์นี้จะนำไปสู่การค้นพบสารทุติยภูมิที่มีความหลากหลายเช่นกัน

Gathogo และคณะ (2004) ทำการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากวัสดุในธรรมชาติโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสตาร์ชเคซีน (starch casein agar) ที่เติมสารต่อต้านเชื้อรา นิสเททินและไซโคลเฮกซอไมด์ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม พบว่าการคัดแยกเชื้อด้วยวิธีนี้ใช้เวลาในการคัดแยกเชื้อสั้นและพบเชื้อสกุลโนโนมูราเอีย (*Nonomuraea*) ได้เพิ่มขึ้น

Shatoury และคณะ (2004) ศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างน้ำเสียทางอุตสาหกรรม สามารถคัดแยกได้ 102 ไอโซเลต จัดจำแนกได้เป็น 10 สกุล คือ *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia*, *Planobispora*, *Kineosporia* และ *Kitasatospora* โดยพบ *Streptomyces* และ *Nocardioides* มากที่สุด ซึ่งแอกติโนมัยซีทสกุลข้างต้นทำกิจกรรมร่วมกันเพื่อย่อยสลายอินทรีย์สารในน้ำ

Hamaki และคณะ (2005) ทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหารที่แตกต่างกัน 11 สูตร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิในช่วง 4-37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตร soil-extract ได้ดีที่สุด

Boudiella และคณะ (2006) ทำการคัดแยกเชื้อสกุล *Streptosporangium* จากตัวอย่างดินที่เก็บได้บริเวณพื้นที่ทะเลทรายซาฮารา ทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอัลจีเรียด้วยวิธี dilution agar plate โดยนำดิน 1 กรัมมาผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการผสมและเจือจางอีกครั้งก่อนนำไปทาบบนผิวหน้าอาหารสูตร chitin-B vitamins บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Srivibool และคณะ (2004) เก็บตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด พบว่ามีแอกติโนมัยซีทจำนวน 567 ไอโซเลตที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ และมี 12 ไอโซเลตที่สามารถผลิต *N*-acylamino acid racemase บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ L-methionine และ D-methionine ได้ปริมาณมาก

Srivibool และ Sukchotiratana (2006) ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่งของ เกาะช้าง เกาะหวาย เกาะเหลาภายใน จังหวัดตราด และเกาะปาย จังหวัดชลบุรี ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหารสูตร actinomycetes isolation agar, starch casein agar และ glucose asparagine agar ได้ 495 ไอโซเลต จัดจำแนกได้ 9 สกุล คือ *Micromonospora*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Streptoalloteichus* และ *Streptoverticillium* โดยพบจำนวนของ *Streptomyces* และ *Actinomadura* มากที่สุด เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ (*Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 885, *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* TISTR 884, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ *Escherichia coli* TISTR 887 (ATCC 25922)) พบว่ามี 48 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวได้

Srivibool และ Sukchotiratana (2006) เก็บตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี ทำการเตรียมตัวอย่างด้วยการนำตัวอย่างดินมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ เจือจางตัวอย่างจนได้ความเจือจาง 10 เท่า และบ่มบนอาหาร starch casein agar และ humic acid vitamin agar จากวิธีดังกล่าวทำให้ได้เชื้อแอกติโนมัยซีท 179 ไอโซเลต ที่มีกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ และเชื้อส่วนใหญ่สามารถผลิตตรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

Ara และคณะ (2007) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Nonomuraea bangladeshensis* และ *Nonomuraea coxensis* จากดินทรายบริเวณชายหาด Coxis Bazar ประเทศบังกลาเทศ ด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร humic acid-vitamin agar ที่เติมไซโคลเฮกซอไมด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นิสเททิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรคนาลิดิซิก (nalidixic acid) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

## 2.4 การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีท

สามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ของเชื้อ ดังนี้

### 2.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)

เป็นลักษณะต่างๆ ที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญชีวิตเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ ลักษณะทางฟีโนไทป์นี้เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนซึ่งมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทนั้นมีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียทั่วไป ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ศึกษาได้แก่

#### 2.4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

มักทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทนั้นสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้ เส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทมี 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยอากาศซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างสูงขึ้นไปบนอากาศ และเส้นใยอาหารซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างแทงลงบนผิวหน้าอาหารมีหน้าที่ในการดูดซึมอาหารมาเลี้ยงส่วนต่างๆ ของเซลล์ เชื้อแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มักสร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด แต่มีบางชนิดไม่สร้างเส้นใยอากาศ เช่น เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) เป็นต้น

สปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สปอร์เปลือย (naked spore) เช่น โคนิเดีย (conidia) และสปอร์ที่อยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) เช่น สปอร์แรงจิโอสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อสามารถใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้เช่นกัน ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีท สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี อยู่ใน cytoplasm ของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic actinomycetes เช่น *Thermoactinomyces* และ *Actinobifida* และ exogenous formation แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ exogenous โดยเฉพาะ *Streptomyces* spp.

Vobis (1997) ได้อธิบายไว้ในหนังสือ Atlas of Actinomycetes เกี่ยวกับลักษณะของสปอร์ไว้ดังนี้

### 1. สปอร์แบบเดี่ยว (single spore)

กลุ่มที่ผลิตสปอร์เดี่ยวเรียกว่า “monosporous” เช่น ลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) มีก้านชูสปอร์เกิดบริเวณเส้นใยอาหาร สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น การเกิดสปอร์เริ่มจากการโป่งพองบริเวณปลายของเส้นใยลงมาจนถึงผนังกั้นจนมีการฟอร์มตัวเป็นผนังสปอร์ เชื้อสกุลเทอร์โมโมโนสปอรา (*Thermomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ บริเวณปลายเส้นใยอาจมีหรือไม่มีการแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์ เชื้อสกุลแซคคาโรโมโนสปอรา (*Saccharomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวมีการพัฒนาบนเส้นใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกกิ่งก้าน ลักษณะของสปอร์เป็นวงรีอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น

### 2. สปอร์มีลักษณะเรียงตัวเป็นเส้นสาย (spores formed in chains)

สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสายเกิดการแบ่งแยกตามขวางของผนัง การแบ่งผนังส่วนนี้ทำให้มีการเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ ลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้จำแนกลักษณะรูปร่างตามความยาวหรือจำนวนของสปอร์ที่แบ่งได้ เช่น disporous หรือ bisporous หมายถึงสปอร์แบบคู่ oligosporous หมายถึงสปอร์จำนวนเล็กน้อยและ polysporous หมายถึงสปอร์จำนวนมากกว่า 2 ขึ้นไป

สปอร์แบบคู่ (disporous) ประกอบด้วยสปอร์ที่อยู่เป็นคู่ตามยาว ได้แก่ เชื้อสกุลไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ขนาด 2 ไมโครเมตร และมีชั้นที่หนาเป็น 3 ถึง 4 เท่าของเส้นใยโคโลนี ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นมาก การเกิดของสปอร์ในช่วงแรกเกิดจากการแยกตัวออกตามความยาวจากเส้นใยอากาศทำให้เกิดเป็นกิ่งก้านสั้นๆ ทางด้านข้างทำให้เกิดการโป่งพองและสร้างผนังกั้นตามแนวขวาง

แอกติโนมัยซีทที่มีสปอร์จำนวนเล็กน้อย (oligosporous) มีการพัฒนาของสปอร์บนสายสั้นๆ ในแต่ละสายจะมีสปอร์อยู่ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ หรือน้อยที่สุดคือมี 3 สปอร์ ก้านชูสปอร์และสปอร์อาจแตกกิ่งก้านได้และเส้นใยอาจมีการหักเป็นท่อนๆ เชื้อสกุลนอคาร์เดีย (*Nocardia*) มีสปอร์ 2 ถึง 7 สปอร์บนก้านชูที่มีขนาดสั้น เชื้อสกุลแอกติโนมาดูรา (*Actinomadura*) และไมโครเตตราสปอรา (*Microtetraspora*) เส้นสายของสปอร์มีขนาดสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศ โดยปกติแอกติโนมาดูรา (*Actinomadura*) มีจำนวนสปอร์มาก 10 ถึง 20 สปอร์บนสายเดียวกันเส้นใยอาจมีลักษณะตรง โค้งงอ หรือเป็นเกลียวได้ เช่น เส้นสายสปอร์ของเชื้อ *Actinomadura pusilla* มีลักษณะค่อนข้างหนาและเป็นเกลียว เชื้อในกลุ่มนี้มีสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสปอแรงเจียของเชื้อสกุลสเตรปโตสปอแรงเจียม (*Streptosporangium*) เรียกว่า ชูโคสปอแรงเจียม (pseudosporangia) ลักษณะของสปอร์สายสั้นสามารถสังเกตได้จากเชื้อ *Sporichthya polymorpha* เส้นใยอากาศจะเกิดการแบ่งตัวจากรูปท่อนเป็นสปอร์ที่มีลักษณะกลม

กลุ่มของแอกติโนมัยซีทที่มีสปอร์จำนวนมาก (polysporus) ได้แก่ เชื้อในสกุลสเตรปโตมัยซีต (*Streptomyces*) ซึ่งมีการพORMรูปร่างเป็นเส้นสายที่ยาวและมีมากกว่า 50 สปอร์ ลักษณะรูปร่างของสปอร์ในแต่ละสปีชีส์ของสเตรปโตมัยซีตจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปหลายรูปแบบ

3. อับสปอร์ที่อยู่ภายในถุงบรรจุสปอร์หรือสปอแรงเจีย (spores formed within-sporangia)

สปอร์ถูกหุ้มด้วยสปอแรงเจียซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้ม สปอร์มีการพัฒนาและห่อหุ้มจนกระทั่งสปอร์แก่จึงมีการปล่อยสปอร์ออกมาจากถุงหุ้ม สปอแรงเจียมีรูปร่างต่างๆ ได้หลายอย่าง เช่น รูปร่างกระบอก รูปร่างคล้ายหลอดหรือท่อ รูปร่างคล้ายขวด รูปร่างคล้ายร่ม หรือรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์มีขนาด 2 ถึง 50 ไมโครเมตร แต่โดยส่วนใหญ่จะมีขนาด 10 ไมโครเมตร

#### 4. โครงสร้างอื่นๆ

แอกติโนมัยซีทบางชนิดมีลักษณะรูปร่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก บางชนิดอาจมีผนังที่หนาหรือมีรูปร่างเป็นทรงกลม บางชนิดสร้างสปอร์บริเวณแกนเส้นใย

##### 2.4.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

###### 1. คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน

เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งในการแยกเชื้อเนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบ คือ

ก. โคแอกกูเลชัน (coagulation) เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้จะปรากฏลักษณะให้เห็นคือ อาหารมีการรวมกลุ่มหรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

ข. เปปโตไนเซชัน (peptonization) หากมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้นลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

###### 2. คุณสมบัติในการย่อยเจลาติน (gelatin)

ความสามารถในการย่อยหรือทำให้เจลาตินเหลวมีประโยชน์ในการดูความแตกต่างของสปีชีส์และชนิดของแบคทีเรีย เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียย่อยเจลาตินโดยใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เมื่อถูกย่อยเจลาตินจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจลซึ่งจะเป็นของเหลวถึงแม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการทดสอบ (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

### 3. คุณสมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

การสลายตัวของไนเตรต เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต ( $\text{KNO}_3$ ) สามารถทดสอบได้โดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟา-แนปทิลลามีน ( $\alpha$ -naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิกและไนเตรต จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) จะรวมตัวกับแนปทิลลามีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye)

### 4. คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อ ซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกทิน (amylopectin) เมื่อต้มแป้งอะไมโลส จะละลายแต่อะไมโลเพกทินจะไม่ละลาย ทั้งอะไมโลส และอะไมโลเพกทิน มีองค์ประกอบคือน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ในอะไมโลส (amylose) น้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4- $\alpha$ -glucosidic ส่วนอะไมโลเพกทิน (amylopectin) มีทั้งพันธะ 1,4- $\alpha$ -glucosidic และพันธะ 1,6- $\alpha$ -glucosidic (ควงพร คันธโชติ, 2537)

การทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรียใช้สารละลายไอโอดีนหยดลงบนผิวอาหารและถ้าเกิดสีแดงถึงสีม่วงบนผิวอาหารแสดงว่าแป้งไม่ถูกย่อยแต่ถ้าไม่ปรากฏสีบนผิวอาหารแสดงว่าบริเวณนั้นมีการย่อยแป้ง

### 5. คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เป็นด่าง แต่มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ดังนั้นในการทดสอบคุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่างจึงเป็นการจัดจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น

### 6. ความสามารถในการทนเกลือ

ในการทดสอบความสามารถในการทนเกลือของเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเจริญในสภาวะที่มีระดับเกลือต่างๆ รวมทั้งสามารถบ่งบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆ ได้ด้วย

### 7. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ้าจากอุณหภูมิสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 3 พวก คือพวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูงเรียกว่า thermophilic bacteria ถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำเรียกว่า psychrophilic bacteria (ควงพร คันธโชติ, 2537) ดังนั้น ในการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันนี้จึงสามารถช่วยในจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีทได้เช่นกัน

## 2.4.2 ลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบภายในเซลล์ (chemotaxonomic characteristics)

### 2.4.2.1 ลักษณะกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)

ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก เป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่งในการวิเคราะห์ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งแอกติโนมัยซีท ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกสามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์จากเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกถูกแยกออกโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือโครมาโตกราฟีชนิดชั้นบางซึ่งมีเซลลูโลสเป็นเฟสคงที่ (Komagata และ Suzuki, 1987) ชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น *LL*-DAP และ *meso*-DAP

แอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* จะมีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *LL*-DAP จัดเป็นแอกติโนมัยซีททั่วไป (common actinomycetes) แอกติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) มีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ *meso*-DAP นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนมัยซีทบางสกุล เช่น *Kitasatospora* นั้นมีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกทั้งสองแบบคือ *LL*-DAP และ *meso*-DAP

### 2.4.2.2 ลักษณะน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลบางชนิดในเปปติโดไกลแคน อาจมีกลูโคซามีน (glucosamine) และกรดมูรามิก (muramic acid) เพิ่มเติมขึ้นมา ซึ่งส่วนประกอบน้ำตาลที่มีบนผนังเซลล์มีประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดและการพิสูจน์สายพันธุ์ของแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและแอกติโนมัยซีท ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบในเซลล์ ช่วยให้สามารถจำแนกชนิดของลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ที่กำหนดไว้โดย Lechevalier และคณะ (1971)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยน้ำตาลบางชนิดอยู่ในส่วนของกลูโคซามีนและกรดมูรามิกในชั้นเปปติโดไกลแคน ตำแหน่งของน้ำตาลถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกและแอกติโนมัยซีท แต่แบคทีเรียบางชนิดก็ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลที่แน่นอน (Komagata และ Suzuki, 1987)

ตัวอย่างของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์ ได้แก่ น้ำตาลไซโลส (xylose) น้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) น้ำตาลแมนโนส (mannose) น้ำตาลไรโบส (ribose) น้ำตาลมาคูโรส (madurose) และ น้ำตาลกลูโคส (glucose) จากลักษณะที่จำเพาะของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์นี้ สามารถจัดรูปแบบของน้ำตาลในเซลล์ได้เป็น 4 รูปแบบ (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, 2546) ได้แก่ ชนิด A ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบินโนสและกาแลคโตสเป็นน้ำตาลหลัก ชนิด B ประกอบด้วยน้ำตาลมาคูโรสเป็นน้ำตาลหลัก ชนิด C เป็นกลุ่มที่ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลเฉพาะ และชนิด D ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

### 2.4.2.3 ลักษณะของโพลาร์ลิปิด (polar lipid)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ ฟอสโฟลิปิดแสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ใน โมเตกุล (Komagata และ Suzuki, 1987)

ฟอสโฟลิปิด ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญ มีดังต่อไปนี้

PA	=	Phosphatidic acid
PC	=	Phosphatidylcholine
PE	=	Phosphatidylethanolamine
PS	=	Phosphatidylserine
PI	=	Phosphatidylinositol
PIMs	=	Phosphatidylinositolmannosides
PG	=	Phosphatidylglycerol
DPG	=	Diphosphatidylglycerol
GluNu	=	An unknown structure containing glucosamine

Lechevalier และคณะ (1981) ได้จัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ดังนี้

PI ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดแทบทุกชนิดยกเว้น phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE), OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylcholine (PC) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)

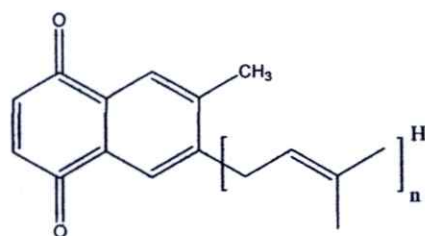
PII ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE) และ OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE) เป็นหลัก แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIII ประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) เป็นหลัก อาจจะมีหรือไม่มี phosphatidylethanolamine (PE) แต่ไม่มีฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

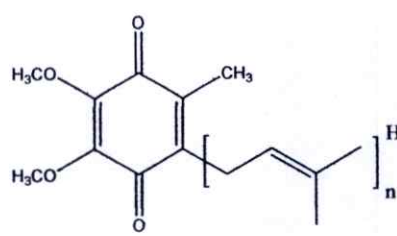
PIV ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE) และ ฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

#### 2.4.2.4 ลักษณะไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต พบไอโซพรีนอยด์ เมนาควิโนน และหรือไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนน (รูปที่ 2.2) แบคทีเรียบางชนิดพบ naphthoquinones เช่น chlorobium quinone พบจาก *Chlorobium thiosulphatophilum* นอกจากนี้จำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene) และระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในสายของไอโซพรีนิล (isoprenyl) ก็เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณหน่วยของไอโซพรีนมักใช้ high-performance liquid chromatography (HPLC) และ reverse-phase thin-layer chromatography ในการวิเคราะห์ (Komagata และ Suzuki, 1987)



Menaquinone



Ubiquinones

รูปที่ 2.1 แสดงไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบในเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ

#### 2.4.2.5 กรดมัคคอลลิก (Mycolic acid)

กรดมัคคอลลิกมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของ b-hydroxyl และ a-branched พบใน *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, และ *Corynebacterium* กรดมัคคอลลิกประกอบด้วยคาร์บอน 70-90 อะตอม ใน 1 กิ่งจะประกอบด้วย 24 คาร์บอน ในสายโซ่แต่ละสายมีตำแหน่งซึ่งประกอบด้วยออกซิเจน 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จัดจำแนกลักษณะของกรดมัคคอลลิก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีกรดมัคคอลลิกเป็นองค์ประกอบพบว่ามีกรดมัคคอลลิกหลายชนิด เช่น ไกลโคไลปิด (glycolipids), ฟีนอลิก ไกลโคไลปิด (phenolic glycolipids) หรือ ไกลโคเปปติโดไลปิด (glycopeptidolipids) (Liu, 1996)

Williams และคณะ (1989) ทำการจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทในระดับสกุลและสปีชีส์ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics) เช่น ลักษณะของผนังเซลล์ (cell wall chemotype) ชนิดของน้ำตาลที่อยู่ในเซลล์ (Whole-cell sugar) ชนิดของฟอสโฟลิปิด (phospholipid type) ตลอดจนชนิดของกรดไดอะมิโนปิเมลิก (diaminopimelic acid type, DAP) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ ลักษณะความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA) (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในยีนช่วง 16S rDNA และ RFLP (restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบชีวสารสนเทศ (bioinformatic) มาเพื่อช่วยตัดสินใจการจำแนกอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

#### 2.4.3 ลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ คือศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา การศึกษาลักษณะของสายดีเอ็นเอ มักศึกษาลำดับเบสของยีนในช่วงต่างๆ ยีนในช่วง 16S rDNA เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยีน 16S rDNA เป็นช่วงยีนบนสายดีเอ็นเอที่มีรหัสสำหรับการสร้างไรโบโซมถูกเลือกนำมาใช้เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ เป็นยีนที่มีอยู่ในแบคทีเรียทุกชนิด เป็นเหมือนยีนลายเซ็น (Signature gene) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของ 16S rDNA ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือยีน 16S rDNA จะมีช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสช่วงนั้นเหมือนกันในทุกแบคทีเรีย ในขณะที่ยีน 16S rDNA ก็มีช่วงที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย ดังนี้

ช่วงที่เหมือนกันจะนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR amplification) การที่สายดีเอ็นเอช่วงนี้มีความเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจึงสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) คือไพรเมอร์นี้สามารถขยายหรือเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ได้จากแบคทีเรียแทบทุกชนิด

ในช่วงของยีน 16S rDNA ที่มีความแตกต่างในแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของแบคทีเรียในระดับสกุลและสปีชีส์ได้โดยการนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความคล้ายคลึงกันและสร้าง phylogenetic tree ซึ่งสามารถบอกสายวิวัฒนาการได้ (ไพร์ตัน สทอง, 2551)

2.4.3.1 เทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท cetus corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้าน จนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การโคลนยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีนและการขาดยีน (point mutations and deletions)

หลักการของ PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการดีคอปิเอตดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 18-24 เบส) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ควรจะถูกควบคุมสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาถูกใจจากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก เช่น ปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า (ไพร์คิน สทอง, 2551)

2.4.3.2 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษากรดนิวคลีอิก โดยการนำเอาอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ามาปฏิรูปร่างงานวิจัยทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล อิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นกระบวนการซึ่งยอมให้โมเลกุลที่มีประจุเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าขนาดของโมเลกุลและความมีประจุเป็นตัวตัดสินใจอัตราการเคลื่อนที่ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กรดนิวคลีอิกแขวนลอยอยู่ในเจลซึ่งทำจากพอลิเอคทิลาไมด์หรือเอกาโรสเป็นเส้นใยเชิงซ้อนที่สานต่อกันเป็นตาข่าย และสามารถควบคุมขนาดของรูของเจลโดยวิธีการเตรียมเจล โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลด้วยอัตราที่ขึ้นอยู่กับน้ำหนักและรูปร่าง โมเลกุล โมเลกุลเล็กๆ หรือ โมเลกุลที่อัดแน่นกันเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่หรือ โมเลกุลหลวมๆ หลังจากปล่อยให้เคลื่อนที่ได้ไปในระยะเวลาหนึ่งปกติ 2-3 ชั่วโมง สามารถตรวจดูตำแหน่งของดีเอ็นเอ โดยการทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และสังเกตเจลด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่แต่ละเลนจะแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ สแกนเนอร์ของคอมพิวเตอร์ถูกใช้เพื่อกำหนดตำแหน่งแถบหรือแบนด์ ดีเอ็นเอ การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีง่ายๆ นี้เป็นวิธีที่มีประโยชน์ยิ่ง (อุไรวรรณ วิจารณ์กุล, 2545)

2.4.3.3 การศึกษาส่วนประกอบของเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสายคู่ (double strand) ประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมิน (thymine, T) กวานีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) สำหรับดีเอ็นเอสายคู่จะมีคู่เบส (base pairing) เป็น  $A \equiv T$  และ  $G \equiv C$  วิธีการวิเคราะห์เบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและกายภาพ ทางเคมีทำได้โดยการย่อยสลายดีเอ็นเอ แต่วิธีการทางกายภาพง่ายกว่า โดยการใช้ความร้อน (ดวงพร กันธโชติ, 2537)

2.4.3.4 ค่า melting temperature ( $T_m$ ) ของดีเอ็นเอจะสัมพันธ์โดยตรงกับค่า G+C content ทั้งนี้เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสกวานีนและไซโตซีน (GC) แข็งแรงกว่าเบสอะดีนีนและไทมิน (AT) เมื่อดีเอ็นเอแยกออกจากกัน ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นจนได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เมื่อเพิ่มความร้อนขึ้นพันธะไฮโดรเจนจะแยกตัวได้มากขึ้นจนถึงระดับที่ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว (ดวงพร กันธโชติ, 2537) การคำนวณหาปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนสามารถคิดได้จากสูตร

$$\text{mole\% GC} = \frac{\text{molesG} + \text{molesC}}{\text{molesG} + \text{molesC} + \text{molesA} + \text{molesT}} \times 100$$

2.4.3.5 การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดไลเซชัน (DNA-DNA hybridization) หลักการคือ การทำดีเอ็นเอสายคู่ให้แยกเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน (denature) จากนั้นนำมาผ่านความเย็น (อุณหภูมิ 10 ถึง 30 องศาเซลเซียส) โดยทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะกลับมาจับคู่กันอีกครั้ง (annealing) การรวมมักเป็นแบบสุ่ม โดยส่วนที่รวมจะมีความคงตัวเรียกว่าการจับคู่ที่คงทน (stable duplex) อัตราในการรวมตัวนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิในช่วงการจับสายดีเอ็นเอ (DNA annealing temperature) และความเข้มข้นของสารประกอบจำพวกเกลือ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์

จากการทดลองผสมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ามีไฮบริดดีเอ็นเอ (hybrid DNA molecules) ทั้ง 2 สายพันธุ์เกิดขึ้น วิธีการตรวจสอบการเกิดไฮบริดดีเอ็นเอ โดยให้แบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง (B) เจริญในอาหารที่มี  $D_2O$  (heavy water) และ  $^{15}NH_4Cl$  ดีเอ็นเอที่ได้จะหนักเนื่องจาก deuterium และ  $^{15}N$  เข้าไปรวมอยู่ ส่วนอีกสายพันธุ์ (A) เจริญในอาหารปกติจึงมีดีเอ็นเอที่น้ำหนักเบากว่า ทำทั้ง 2 สายให้เสียสภาพแล้วนำมาผสมกันให้เกิดการจับคู่กันอีกครั้ง ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง nucleic acid hybridization จะต้องแสดงได้ในเทอมปริมาณเพื่อจะได้นำมาใช้ในการจัดจำแนก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีจุดอ้างอิงเฉพาะ โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์อ้างอิง การหาปริมาณหรือคิกรีของการเกิดสายผสม เมื่อสายเดี่ยวของดีเอ็นเอจากสายพันธุ์อ้างอิงจับคู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวของดีเอ็นเอจากสายพันธุ์อื่นว่าสัมพันธ์มากน้อยเพียงใด เปรียบเทียบกับเมื่อจับคู่กับ homologous และ heterologous ของสายเดี่ยวที่ติดฉลาก (label) ด้วยสารกัมมันตรังสีแล้วทำให้เกิดการจับคู่กัน ปริมาณของสารกัมมันตภาพรังสีที่รวมตัวกับดีเอ็นเออ้างอิงเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการเกิดสายผสม การเตรียมดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจากสายพันธุ์อ้างอิงทำให้เกิดการเสียสภาพโดยความร้อนแล้วผสมกับ molten agar ซึ่งอยู่ในสภาพเจล ในเจลนี้สายเดี่ยวที่ยาวจะเกาะอยู่และไม่เกิดการรวมตัวกัน นำดีเอ็นเอจาก heterologous strain และสายพันธุ์อ้างอิง ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีการติดฉลากสารตั้งต้น (precursor) ของกรดนิวคลีอิก ดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกตัดเป็นชิ้นส่วนสั้นๆ เพื่อที่จะแพร่กระจายลงในดีเอ็นเอเอการ์ (DNA agar) แล้วทำให้อยู่ในสภาพร้อนจนเกิดการเสียสภาพแล้วนำมาผสมกับดีเอ็นเอเอการ์ (DNA agar) ดีเอ็นเอเอการ์ (DNA agar) จะถูกล้างเพื่อกำจัดดีเอ็นเอกัมมันตรังสี (radioactive DNA) ส่วนที่ไม่ได้ร่วมจับ แล้วคำนวณหาปริมาณของสารกัมมันตรังสีในวุ้น (ควงพร คันทโชติ, 2537)

#### 2.4.4 การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท

Stackebrandt และคณะ (1997) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของ เซลล์และลักษณะทางจีโนมไทป์ในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคติโนแบคทีเรีย โดยสามารถจำแนกได้เป็น 5 คลาสย่อย 5 อันดับ 10 อันดับย่อย 30 วงศ์ และ 95 สกุล และต่อมาในปี 2009 Zhi และคณะ ได้ทำการปรับระบบของการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทให้เป็น ปัจจุบัน ดังรูปที่ 2.2

##### Class Actinobacteria

Subclass <i>Acidimicrobiae</i>	Order <i>Acidimicrobiales</i>	Family <i>Acidimicrobiaceae</i>
Subclass <i>Rubrobacteridae</i>	Order <i>Rubrobacterales</i>	Family <i>Rubrobacteraceae</i>
Subclass <i>Coriobacteridae</i>	Order <i>Coriobacterales</i>	Family <i>Coriobacteriaceae</i>
Subclass <i>Sphaerobacteridae</i>	Order <i>Sphaerobacterales</i>	Family <i>Sphaerobacteraceae</i>
Subclass <i>Actinobacteridae</i>	Order <i>Actinomycetales</i>	

##### Suborder

##### *Actinomycineae*

##### Family

*Actinomycetaceae*

##### Suborder

##### *Micrococchineae*

##### Family

*Micrococcaceae*

*Dermatophilaceae*

*Beutenbergiaceae*

*Bogoriellaceae*

*Brevibacteriaceae*

*Cellulomonadaceae*

*Dermabacteraceae*

*Dermacoccaceae*

*Intrasporangiaceae*

*Jonesiaceae*

*Microbacteriaceae*

*Promicromonosporaceae*

*Rarobacteraceae*

*Sanguibacteraceae*

*Yaniellaceae*

##### Suborder

##### *Corynebacterineae*

##### Family

*Corynebacteriaceae*

*Dietziaceae*

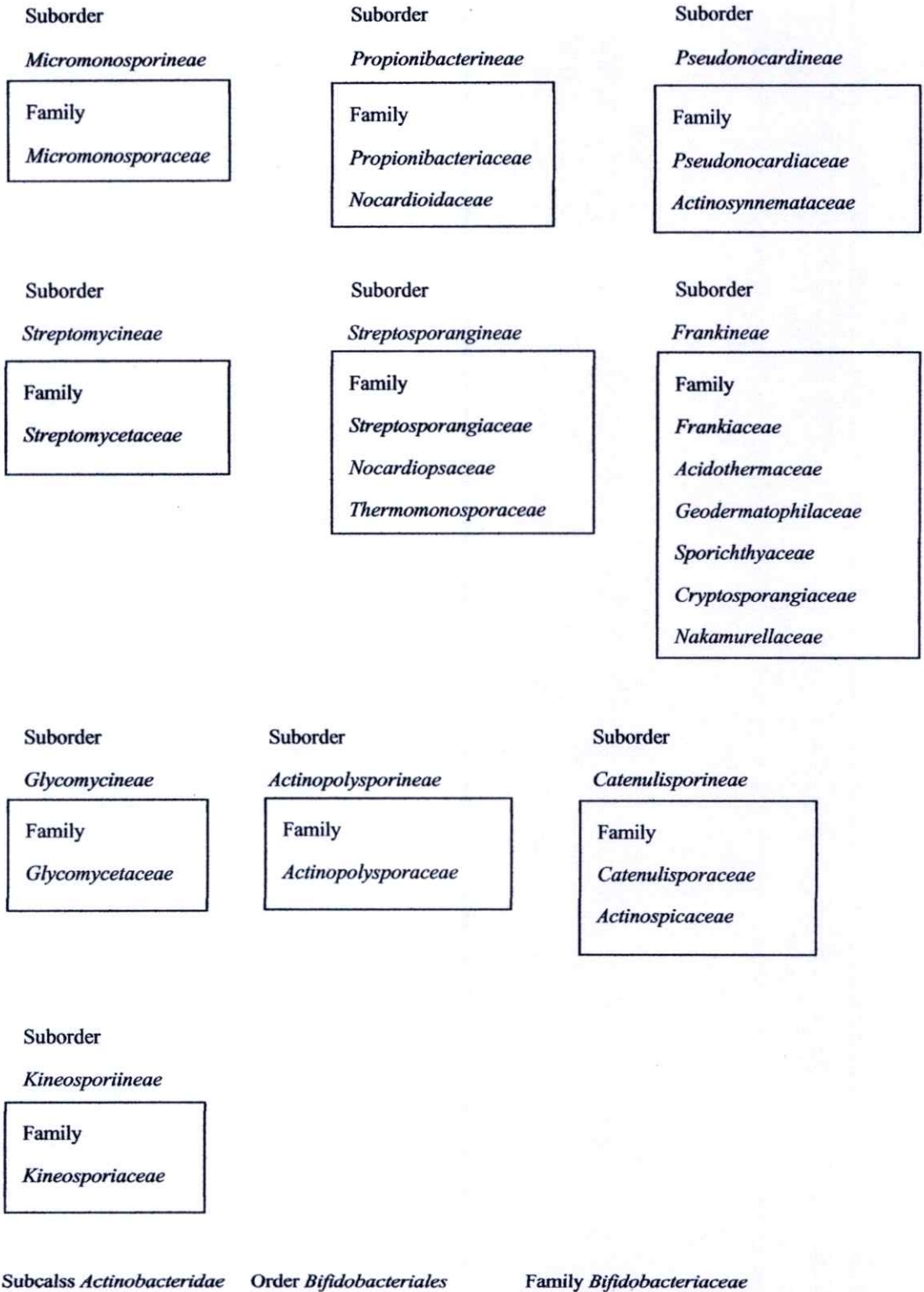
*Nocardiaceae*

*Tsukamurellaceae*

*Mycobacteriaceae*

*Segniliparaceae*

รูปที่ 2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคติโนแบคทีเรีย



รูปที่ 2.2 แสดงอนุกรมวิธานของเชื้อในคลาสแอคทีโนแบคทีเรีย (ต่อ)

เชื้อแอกติโนมัยซีทอยู่ในคลาสย่อยแอกติโนแบคทีริเด (Subclass *Actinobacteridae*) อันดับแอกติโนมัยซีตาเลส (Order *Actinomycetales*) ซึ่งประกอบด้วย 13 อันดับย่อย (Suborder) คือ

1. อันดับย่อยแอกติโนมัยซินีอี (Suborder *Actinomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 127 : 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือวงศ์แอกติโนมัยซีตาซีอี (Family *Actinomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Actinomyces*, *Mobiluncus* และ *Arcanobacterium*

2. อันดับย่อยไมโครคอคคินีอี (Suborder *Micrococcineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) ประกอบด้วย 15 วงศ์คือ

2.1 วงศ์ไมโครคอคคาซีอี (Family *Micrococcaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 8 สกุลได้แก่ *Micrococcus*, *Acaricomex*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium*, *Rothia* และ *Zhihengliuella*

2.2 วงศ์เซลลูโลโมนาดาซีอี (Family *Cellulomonadaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 5 สกุลได้แก่ *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Actinotalea*, *Demequina* และ *Tropheryma*

2.3 วงศ์โพรไมโครโมนอสปอราซีอี (Family *Promicromonosporaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 6 สกุลได้แก่ *Promicromonospora*, *Cellulosimicrobium*, *Myceligenerans*, *Xylanibacterium*, *Xylanimicrobium* และ *Xylanimonas*

2.4 วงศ์เดอร์มาโตฟิลาซีอี (Family *Dermatophilaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุลได้แก่ *Dermatophilus* และ *Kineosphaera*

2.5 วงศ์เบรวิแบคทีเรียซีอี (Family *Brevibacteriaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Brevibacterium*

2.6 วงศ์เดอมาแบคทีราซีอี (Family *Dermabacteraceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 2 สกุลได้แก่ *Dermabacter* และ *Brachybacterium*

2.7 วงศ์อินทราสปอแรนเจียซีอี (Family *Intrasporangiaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 16 สกุลได้แก่ *Intrasporangium*, *Arsenicococcus*, *Humihabitans*, *Janibacter*, *Knoellia*, *Kribbia*, *Lapillicoccus*, *Marihabitans*, *Ornithinicoccus*, *Ornithinimicrobium*, *Oryzihumus*, *Phycococcus*, *Serinicoccus*, *Terracoccus*, *Tetrasphaera* และ *Terrabacter*

- 2.8 วงศ์โจเนเซียซีอี (Family *Jonesiaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Jonesia*
- 2.9 วงศ์ไมโครแบคทีเรียซีอี (Family *Microbacteriaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 27 สกุลได้แก่ *Agreia*, *Agrococcus*, *Agromyces*, *Clavibacter*, *Cryobacterium*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Fronduhabitans*, *Glaciibacter*, *Gulosibacter*, *Klugiella*, *Labeledella*, *Leifsonia*, *Leucobacter*, *Microbacterium*, *Microcella*, *Microterricola*, *Mycetocola*, *Okibacterium*, *Plantibacter*, *Phycicola*, *Pseudoclavibacter*, *Rathayibacter*, *Rathayibacter*, *Rathayibacter*, *Salinibacterium*, และ *Yonghaparkia*
- 2.10 วงศ์บิวเทนเบอเกียซีอี (Family *Beutenbergiaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Beutenbergia*, *Georgenia* และ *Salana*
- 2.11 วงศ์โบโกแรลลาซีอี (Family *Bogoriellaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Bogoriella*
- 2.12 วงศ์เดอมาคอคคาซีอี (Family *Dermacoccaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Dermacoccus*, *Demetria* และ *Kytococcus*
- 2.13 วงศ์ราโบแบคเทอราซีอี (Family *Rarobacteraceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Rarobacter*
- 2.14 วงศ์แซงกีแบคเทอราซีอี (Family *Sanguibacteraceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Sanguibacter*
- 2.15 วงศ์ยานเนลลาซีอี (Family *Yaniellaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Yaniella*
3. อันดับย่อยโครีเนแบคทีรีนอี (Suborder *Corynebacterineae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์คือ
- 3.1 วงศ์โครีเนแบคทีเรียซีอี (Family *Corynebacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื่อในวงศ์นี้มี 2 สกุลได้แก่ *Corynebacterium* และ *Turicella*
- 3.2 วงศ์มัคโคแบคทีเรียซีอี (Family *Mycobacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Mycobacterium*
- 3.3 วงศ์นอคาร์เดียซีอี (Family *Nocardiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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-C) และ 1000:1040 (A-U) เชื่อในวงศ์นี้มี 5 สกุลได้แก่ *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Millisia* และ *Williamsia*

3.4 วงศ์ทซึกามูเรลลาซีอี (Family *Tsukamurellaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลของเชื้อที่อยู่ในวงศ์นี้ได้แก่ *Tsukamurella*

3.5 วงศ์ไดเอทเซียซีอี (Family *Dietziaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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 1115:185 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Dietzia*

3.6 วงศ์เซกนิลิปาราซีอี (Family *Segniliparaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Segniliparus*

4. อันดับย่อยไมโครโมโนสปอริเนียอี (Suborder *Micromonosporineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือวงศ์ไมโครโมโนสปอราซีอี (Family *Micromonosporaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 17 สกุลได้แก่ *Micromonospora*, *Actinocatenispora*, *Actinoplanes*, *Asanoa*, *Catellatospora*, *Couchioplanes*, *Catenuloplanes*, *Dactylosporangium*, *Longispora*, *Pilimelia*, *Polymorphospora*, *Planosporangium*, *Pseudosporangium*, *Salinispora*, *Spirilliplanes*, *Verrucosispora* และ *Virgisporangium*

5. อันดับย่อยโพรไพโอเนอแบคทีเรียอี (Suborder *Propionibacterineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์คือ

5.1 วงศ์โพรไพโอเนอแบคทีเรียซีอี (Family *Propionibacteriaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 12 สกุลได้แก่ *Aestuariimicrobium*, *Friedmanniella*, *Granulicoccus*, *Propionibacterium*, *Luteococcus*, *Microplanus*, *Micropruina*, *Propionicicella*, *Propionicimonas*, *Propioniferax*, *Propionimicrobium* และ *Tessaracoccus*

5.2 วงศ์นอคาร์ดิโออิดาเซียอี (Family *Nocardioideaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) เชื้อ

ในวงศ์นี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Nocardioides*, *Actinopolymorpha*, *Aeromicrobium*, *Kribbella* และ *Marmoricola*

6. อันดับย่อยชูโคนอคาร์ดินีอี (Suborder *Pseudonocardineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์คือ

6.1 วงศ์ชูโคนอคาร์เดียซีอี (Family *Pseudonocardiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 211 (G), 480 (U) และ 142:221 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 12 สกุล ได้แก่ *Actinoalloteichus*, *Actinomycetospora*, *Amycolatopsis*, *Crossiella*, *Kibdelosporangium*, *Kutzneria*, *Goodfellowiella*, *Prauserella*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, และ *Thermocrispum*

6.2 วงศ์แอคติโนซินนีมาตาซีอี (Family *Actinosynnemataceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 211 (A), 480 (G) และ 142:221 (C-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 6 สกุล ได้แก่ *Actinosynnema*, *Actinokineospora*, *Lechevalieria*, *Lentzea*, *Saccharothrix* และ *Umezawae*

7. อันดับย่อยสเตรปโตมัซซินีอี (Suborder *Streptomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือสเตรปโตมัซซิดาซีอี (Family *Streptomycetaceae*) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*

8. อันดับย่อยสเตรปโตสปอแรงจินีอี (Suborder *Streptosporangineae*) ประกอบด้วย 3 วงศ์คือ

8.1 วงศ์สเตรปโตสปอแรงเจียซีอี (Family *Streptosporangiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 440:497 (C-G), 485 (U), 501:544 (C-G), 502:543 (G-C), 833:853 (U-G) และ 1355:1367 (A-U) เชื้อในวงศ์นี้มี 10 สกุล ได้แก่ *Acrocarpospora*, *Streptosporangium*, *Herbidospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Nonomuraea*, *Planotetraspora* และ *Thermopolyspora*

8.2 วงศ์นอคาร์ดิออปซาซีอี (Family *Nocardiopsaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 440:497 (U-U), 485 (G), 501:544 (G-C), 502:543 (A-U), 833:853 (U-G) และ 1355:1367 (G-C) เชื้อในวงศ์นี้มี 4 สกุล ได้แก่ *Nocardiopsis*, *Haloactinospora*, *Streptomonospora* และ *Thermobifida*

8.3 วงศ์เทอร์โมโมโนสปอราซีอี (Family *Thermomonosporaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 4 สกุล ได้แก่ *Thermomonospora*, *Actinocorallia*, *Actinomadura* และ *Spirillospora*

9. อันดับย่อยแฟรนคีนีอี (Suborder *Frankineae*) ประกอบด้วย 6 วงศ์คือ

9.1 วงศ์แฟรนเคียซีอี (Family *Frankiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Frankia*

9.2 วงศ์จีโอเดอร์มาโตฟิลาซีอี (Family *Geodermatophilaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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), 1059:1198 (U-A) และ 1027:1034 (C-G) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Geodermatophilus*, *Blastococcus* และ *Modestobacter*

9.3 วงศ์สปอริชยาซีอี (Family *Sporichthyaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Sporichthya*

9.4 วงศ์ซิโคเทอร์มาซีอี (Family *Acidothermaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Acidothermus*

9.5 วงศ์คริปโตสปอแรงเจียซีอี (Family *Cryptosporangiaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Cryptosporangium*

9.6 วงศ์นากามูเรลาซีอี (Family *Nakamurellaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื้อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Nakamurella*, *Humicoccus* และ *Saxeibacter*

10. อันดับย่อยไกลโคมัซซินีอี (Suborder *Glycomycineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือวงศ์ ไกลโคมัยซีตาซีอี (Family *Glycomycetaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Glycomyces*

11. อันดับย่อยแอกติโนโพลีสปอริเนีย (Suborder *Actinopolysporineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือวงศ์ แอกติโนโพลีสปอราซีอี (Family *Actinopolysporaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Actinopolyspora*

12. อันดับย่อยคาเทนูลิสปอริเนีย (Suborder *Catenulisporineae*) ประกอบด้วย 2 วงศ์คือ

12.1 วงศ์คาเทนูลิสปอราซีอี (Family *Catenulisporaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ 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) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Catenulispora*

12.2 วงศ์แอกติโนสปิคาซีอี (Family *Actinospicaceae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของวงศ์นี้อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 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) เชื่อในวงศ์นี้มี 1 สกุลได้แก่ *Actinospica*

13. อันดับย่อยไคนีโอสปอริเนีย (Suborder *Kineosporiineae*) รูปแบบของ 16S rRNA signatures nucleotides ของอันดับย่อยนี้อยู่ ณ 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) ประกอบด้วย 1 วงศ์คือวงศ์ไคนีโอสปอเรียซีอี (Family *Kineosporiaceae*) เชื่อในวงศ์นี้มี 3 สกุลได้แก่ *Kineosporia*, *Kineococcus* และ *Quadrisphaera*

## 2.5 ประโยชน์ของเชื้อกลุ่มแอกติโนมัยซีท

ปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดจากเชื้อแอกติโนมัยซีทอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้พัฒนาตัวเองจนสามารถคือยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากขึ้น ในจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่าแอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มที่มีความน่าสนใจมากที่สุด โดยเฉพาะสกุลสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces*) (ตารางที่ 2.1) จัดเป็นแหล่งผลิตยาปฏิชีวนะแหล่งใหญ่ (*Boudiella* และคณะ, 2006) เนื่องจากค้นพบได้ง่ายและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อเกิดขึ้นในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ จำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็น family หรือ series ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่มักจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) โดยการเพาะเชื้อในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture (vegetative) ลงในอาหาร ในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมีกระบวนการสันดาป (metabolism) และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยนวิถีชีวเคมี (biochemical pathway) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา (Isaac และ Jennings, 1995)

อานัฐ ตันโซ (2551) ได้เขียนบทความในหัวข้อ บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในการเกษตร ระบุว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทบางชนิดสามารถสร้างสารแอกติโนมัยซิน (actinomycin) และ ออริโอมัยซิน (aureomycin) ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อโรคต่างๆ

การค้นพบสารปฏิชีวนะแหล่งใหม่จากแอกติโนมัยซีทในสกุลอื่นๆ ที่ไม่ใช่สกุล สเตรปโตมัยซีต (*streptomyces*) มีเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างของสารทุติยภูมิที่สร้าง ได้แก่

แวนโคมัยซิน (vancomycin) และ ริฟามัยซิน (rifamycin) ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุล อมัยโคลาโทปซิส (*Amycolatopsis*)

อิริโทรมัยซิน (erythromycin) และสารที่มีฤทธิ์ต้านโรคติดเชื้อในปอด (farmer's lung-disease) ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุลแซคคาโรโพลีสปอรา (*Saccharopolyspora*)

อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside), เจ็นตามิซิน (gentamicin) และแอสโตรมิซิน (astromycin) ผลิตได้จากเชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*)

ไรแฟมมัยซินโอ (rifamycin O) และไรแฟมมัยซินเอส (rifamycin S) ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Thermomonospora formosensis*

เบนานอมิซิน (benanomicin) และแอสเพอรามิซิน (esperamicin) ที่ผลิตได้จากเชื้อสกุลแอกติโนมอดูรา (*Actinomadura*) (Miyadoh, 1997)

นอกเหนือจากเชื้อแอกติโนมัยซีทจะมีประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว ยังมีบทบาทในด้านอื่นอีกมากมายเช่น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงดินโดยแอกติโนมัยซีทจะสังเคราะห์อินทรีย์สารในดินให้เป็นน้ำตาลและสังเคราะห์กรดอะมิโน เป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยหมัก กระตุ้นให้ *Azotobacotor* และ *Mycorrhiza* ในดินทำงานได้ดีขึ้น ลดอัตราการพังทลายของหน้าดิน

ทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อราที่ไม่มีประโยชน์และพวก anaerobic bacteria จึงสามารถเปลี่ยนดินที่มีเชื้อโรคให้หมดสภาพไปทำให้ลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช นอกจากนี้ยังช่วยสลายเปลือกเมล็ดพืชทำให้งอกเร็วขึ้น รวมถึงใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (เกรียงไกร และคณะ, 2539)

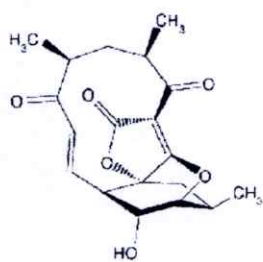
กรรณิการ์ ดวงมาลย์ (2552) ทำการเก็บดินรอบรากข้าวจากนา ในจังหวัดสุพรรณบุรี เชียงใหม่ กาฬสินธุ์ นนทบุรี กรุงเทพฯ และดินรอบรากพืชที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม หลังทำการแยกเชื้อพบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อสเตรปโตมัยซีท จากนั้นศึกษาคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพร้อมกับจำแนกสายพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งโรคในนาข้าวโดยเฉพาะแปลงเกษตรอินทรีย์พบว่าเชื่อดังกล่าวมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ดข้าวได้ อีกทั้งยังมีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวได้ดีเหมือนกับ *Streptomyces hygroscopicus*

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์และจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ (Coyne, 1999)

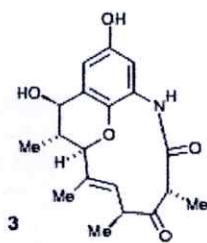
ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ (ชนิด)
<b>เชื้อรา</b>	
<i>Phycomycetes</i>	14
<i>Ascomycetes</i>	299
<i>Penicillium</i>	123
<i>Aspergillus</i>	115
<i>Basidiomycetes</i>	140
Imperfect fungi	315
<b>แบคทีเรีย</b>	
<i>Pseudomonas</i>	171
<i>Enterobacteria</i>	36
<i>Micrococci</i>	16
<i>Lactobacilli</i>	28
<i>Bacilli</i>	338
<i>Miscellaneous bacteria</i>	274
<b>แอกติโนมัยซีท</b>	
<i>Mycobacterium</i>	4
<i>Actinoplanes</i>	18
<i>Streptomyces</i>	3,872
<i>Micromonospora</i>	41
<i>Thermoactinomyces</i>	17
<i>Nocardia</i>	48
แอกติโนมัยซีทสกุลอื่นๆ	2,078

ตารางที่ 2.2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก

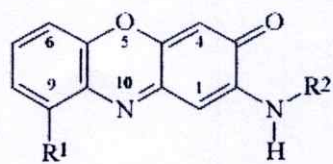
สารประกอบ	สายพันธุ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Abyssomicins (1)	<i>Verrucosispora</i> sp	Antibacterial	Riedlinger และคณะ, 2004
Cebulactams (2)	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	Antibacterial; antioxidant	Pimentel-Elardo และคณะ, 2008
Chandrananimycins (3)	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialagi; antibacterial; anticancer; antifungal	Maskey และคณะ, 2003
Proximicin (4)	<i>Verrucosispora</i> sp.	Anticancer	Philip และคณะ, 2008
Ikarugamycin (5)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial, antiprotozoal, antiulcer	Bruntner และคณะ, 2005
Chloro-dihydroquinones (6)	<i>Novelactinomycete</i> sp	Antibacterial; anticancer	Soria-Mercado และคณะ, 2005
Diazepinomicin (ECO-4601) (7)	<i>Micromonosproa</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory	Charan และคณะ, 2004
Helquinoline (8)	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial	Asolkar และคณะ, 2004
Mechercharmycins (9)	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh และคณะ, 2005
SalinosporamideA (NPI-0052) (10)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling และคณะ, 2003



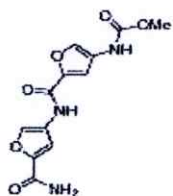
Abyssomicins (1)



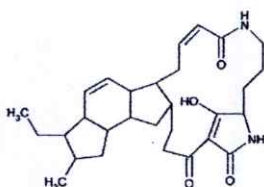
Cebulactams(2)



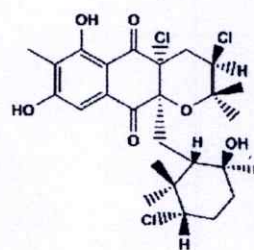
Chandrananimycins (3)



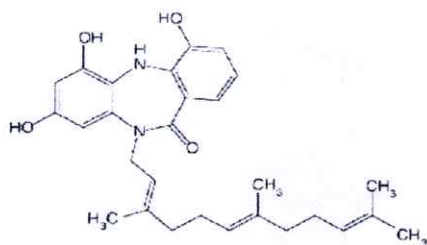
Proximicin (4)



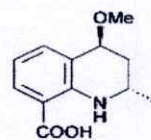
Ikarugamycin (5)



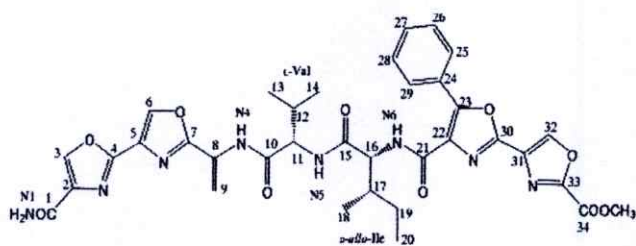
Chloro-dihydroquinones (6)



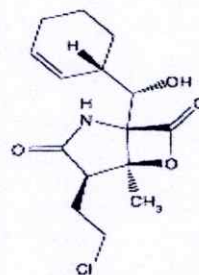
Diazepinomicin (7)



Helquinoline (8)



Mechercharmycins (9)



Salinosporamide A (10)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสารประกอบที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีตาหายาก

## 2.6 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (โครงการจัดการระบบฐานข้อมูลทรัพยากรในเขตอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2548)

### 2.6.1 ที่ตั้งและอาณาเขต

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีเนื้อที่ประมาณ 894 ตารางกิโลเมตร หรือ 558,750 ไร่ ตั้งอยู่ในท้องที่ตำบลปางตาไว อำเภอคลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร และตำบลแม่เลย์ ตำบลห้วยน้ำหอม อำเภอลาดยาว จังหวัดนครสวรรค์ อยู่ห่างจากตัวเมืองกำแพงเพชรประมาณ 77 กิโลเมตร หรืออยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 15 องศา 40 ลิปดา ถึง 16 องศา 05 ลิปดาเหนือ และอยู่ระหว่างเส้นแวงที่ 99 องศา 05 ลิปดา ถึง 99 องศา 02 ลิปดาตะวันออก (โครงการจอมป่า, 2548)

พื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีพื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คือจังหวัดกำแพงเพชรและจังหวัดนครสวรรค์ ส่วนที่อยู่ในจังหวัดนครสวรรค์เรียกว่าป่าแม่วงก์-แม่เป็น ส่วนที่อยู่ในจังหวัดกำแพงเพชร เรียกว่าป่าคลอง แม่วงก์-ป่าคลองขลุง พื้นที่ทิศเหนือของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ติดกับอุทยานแห่งชาติคลองลาน ทิศใต้ติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และทิศตะวันตกติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอุ้มผาง จังหวัดตาก

### 2.6.2 สภาพภูมิประเทศ

เป็นที่อกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัยลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ประมาณ 40-50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือยอดเขาโมโกจูสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ ในส่วนของพื้นที่ราบมีไม่มากส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำและเป็นแหล่งแร่ธาตุสำคัญ เช่น แร่ไมก้า

### 2.6.3 สภาพภูมิอากาศ

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ในช่วงฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน-เดือนกุมภาพันธ์ อากาศค่อนข้างหนาวเย็นอันเนื่องมาจากกลุ่มความกดอากาศสูงมาจากประเทศจีนแผ่ลงมาทางตอนใต้เข้าสู่ประเทศไทยตอนบนและปกคลุมทั่วประเทศ ลมที่พัดสู่ประเทศไทยในฤดูนี้คือลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนช่วงฤดูร้อนเริ่มต้นจากเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม อากาศค่อนข้างร้อนจัดและมีฝนตกน้อย ทำให้เป็นสังคมพืชป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณผลัดใบ สำหรับฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน - เดือนตุลาคม มีปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1,100 มิลลิเมตรต่อปี

### 2.6.4 ลักษณะผืนป่าและพืชพรรณ

ป่าเบญจพรรณ อยู่บริเวณที่ราบริมฝั่งห้วยและภูเขาที่ไม่สูงนัก พันธุ์ไม้ที่พบได้แก่ สัก เสลา ชิงชัน กระบาก กระพี้เขาควาย มะค่าโมง จีวป่า ประดู่ป่า กาสามปึก ติ้ว มีไม้ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่หลายชนิด เช่น ไม้ป่า ไม้ไร่ ไม้ชางนวล ไม้รวก พืชพื้นล่าง เช่น หนามเตี้ย ส้มเสี้ยว หนามคนทา เป็นต้น ป่าเต็งรัง ขึ้นอยู่สลับกับป่าเบญจพรรณ พบในช่วงระดับความสูงตั้งแต่ 100-1,000 เมตรจาก

ระดับน้ำทะเล พันธุ์ไม้ที่พบได้แก่ เต็ง รัง เหียง พลวง กราด มะกั้ม ประคู้ มะม่วงป่า มะค่าแต้  
พะยอม มะขามป้อม สมอไทย ฯลฯ พืชพื้นล่างที่พบ เช่น ไม้เพ็ก และปรัง เป็นต้น

ป่าดิบเขา พบขึ้นอยู่ในบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,300-1,500 เมตร  
พันธุ์ไม้ที่พบได้แก่ ก่อใบเลื่อม ก่อเคียว ก่อลิ้น ก่อแอบ ทะโล้ จำปาป่า กะเพราต้น หนอน-  
ขี้ควาย กำลั้งเสื่อโคร่ง ค้างคอง กล้วยฤาษี และมะนาวควาย เป็นต้น

ป่าดิบแล้ง ประกอบด้วย ขางแดง ขางนา กระบาก ตะเคียนหิน ปออีเก้ง สมพง กัดลิ้น  
มะหาด พลอง นอกจากนี้ยังมีไม้พุ่มและพืชพื้นล่างต่างๆ ที่ทนร่มอีกมากมายหลายชนิด เช่น เข็มขาว  
หนามคนทา ว่าน พืชหัวต่างๆ อีกทั้งกล้วยไม้ต่างๆ อีกมากมาย

ทุ่งหญ้า พบกระจุกกระจายไปตามป่าประเภทต่างๆ ที่มีอยู่ เกิดจากการทำลายป่าของชาวเขา  
เผ่าต่างๆ ที่เคยอยู่อาศัยในพื้นที่ สังคมพืชที่ขึ้นทดแทนในพื้นที่ได้แก่ หญ้าคา หญ้าวัวหนู เถา  
สาบเสือ พง แคมพลวง มะเคื่อ ไมยราบเครือ ไมยราบต้น ลำพูป่า หว่า ติวแดง จั้วป่า มะเคื่อหอม  
 เป็นต้น



## บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น F-G009
2. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น genie 2
3. เครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) รุ่น TK100
4. ออโตปิเปต (automatic pipette)
5. หลอดทดลองขนาดเล็ก (eppendorf tube)
6. แผ่นทิน-เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (TLC) ขนาด 10X10 เซนติเมตร no. 5716
7. แผ่นทิน-เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (TLC) ขนาด 20X20 เซนติเมตร no. 1.05715 kieselgel 60 F<sub>254</sub>
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 ประเทศไทย
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น minispin plus ประเทศไทย
11. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น 8540
12. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น LFBH-120
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HM-35V
14. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น OLYMPUS CH-2
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SG-120
16. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (vacuum evaporator) รุ่น R-200
17. เครื่องเขย่า (shaker)
18. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction) รุ่น DYAD ALD1244
19. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (nanodrop spectrophotometer) รุ่น ND-100
20. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น UL4-1320

### 3.2 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
3. แอลกอฮอล์ 99 เปอร์เซ็นต์ (ethanol)
4. เบสึกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate)

5. กลีเซอรอล (glycerol)
6. ไอโอดีน
7. กรดซัลฟานิก (sulfanilic acid)
8. ไดเมทิลเนฟทิลลามีน (*N,N*-dimethyl-1-naphthylamine)
9. เมทานอล (methanol)
10. ไพริดีน (pyridine)
11. นินไฮดริน (ninhydrin)
12. เอ็น-บิวทานอล (n-butanol)
13. เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)
14. คลอโรฟอร์ม (chloroform)
15. กรดอะซิติก (acetic acid)
16. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid)
17. อะซีโตน (acetone)
18. แบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )
19. โทลูอีน (toluene)
20. แอนิลีน (aniline)
21. กรดพทาลิก (phthalic acid)
22. สารละลาย TE buffer
23. ไลโซไซม์ (lysozyme)
24. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)
25. ฟีนอล (phenol)
26. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol)
27. เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase)
28. เอนไซม์โปรตีนเนส เค (proteinase K)
29. เอนไซม์นิวคลีเอส พี1 (nuclease  $\text{P}_1$ )
30. เอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase)
31. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline solution, PBS solution)
32. โฟโตไบโอติน (photobiotin)
33. สารละลายดีเอ็นเอไฮบริดไดเซชัน (hybridization solution)
34. สารละลายพรีไฮบริดไดเซชัน (prehybridization)
35. ซาลีน โซเดียมซิเตรต (SSC)
36. สารละลายสเตรปตาวิดอินเปอร์ออกซิเดส (streptavidin-peroxidase)

37. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)
38. สารละลายเตตระเมทิล เบนซิไดน์-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (tetramethyl benzidine –  $H_2O_2$ )

### 3.3 จุลินทรีย์

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
2. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
5. *Escherichia coli* ATCC 25922
6. *Candida albicans* ATCC 10231

### 3.4 ตัวอย่างที่ใช้คัดแยกแอกติโนมัยซีทหายาก

คัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินตัวอย่างทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ได้แก่ ตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง ซากอินทรีย์สาร 3 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างดินให้เก็บดินจากผิวหน้าดินและรักษาอุณหภูมิของตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งถึงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

### 3.5 วิธีการเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อ

#### 3.5.1 การเตรียมตัวอย่างโดยการผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air-drying treatment)

นำตัวอย่างมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในสารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที และเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) 30 วินาที 2 ครั้ง แล้วเจือจางตัวอย่างโดยการดูดสารละลายตัวอย่างดิน 1 มิลลิลิตรด้วยสารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจางที่  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-5}$  ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่  $10^{-3}$   $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AV-medium, humic acid vitamin agar และ soil extract medium (ภาคผนวก ก) ที่เติมวิตามินผสมสูตร 1 (vitamins mix 1) (ภาคผนวก ก) กรคนาลิดิซิก (nalidixic acid) 25-50 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และเทอร์บินาฟีน (terbinafin) 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 ถึง 28 วัน

### 3.5.2 การเตรียมตัวอย่างโดยการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

#### (dried-heat treatment)

นำตัวอย่างมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิทบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง นำตัวอย่างมาอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมใส่ในสารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที และเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) 30 วินาที 2 ครั้ง เจือจางตัวอย่างในสารละลาย เบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  คูดตัวอย่างเจือจางที่  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร humic acid vitamin agar และ อาหารสูตร soil extract medium ที่เติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 21 ถึง 28 วัน

### 3.5.3 การเตรียมตัวอย่างโดยการต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

#### (moist-heat treatment)

นำตัวอย่างมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิทบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมใส่ในสารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที และเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) 30 วินาที ทำ 2 ครั้ง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เจือจางตัวอย่าง โดยการคูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจางที่  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  คูดสารละลายตัวอย่างเจือจางที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AV-medium อาหารสูตร humic acid vitamin agar และ อาหารสูตร soil extract medium ที่เติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 ถึง 28 วัน

### 3.5.4 การเตรียมตัวอย่างโดยการใส่สารละลายฟีนอล (phenol treatment)

นำตัวอย่างมาผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิทบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมใส่ในสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที บ่มตัวอย่างที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างโดยการคูดสารละลายข้างต้น 1 มิลลิลิตรในเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  คูดสารละลายตัวอย่างเจือจางที่  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AV-medium อาหารสูตร humic acid vitamin agar และอาหารสูตร soil extract medium ที่เติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 ถึง 28 วัน

### 3.6 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หายาก

หลังจากบ่มครบกำหนดเวลานำมาทำการแยกเชื้อเลือกเฉพาะ โคลินี่ที่คาดว่าน่าจะเป็นแอกติโนมัยซีทที่หายาก โดยสังเกตคุณลักษณะของสปอร์และการสร้างเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีหัวเลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) ใช้เข็มเย็บเย็บขนาดเล็ก (micro needle) เย็บเชื้อแอกติโนมัยซีทมาซึดลากบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้วทำให้เชื่อนั้นบริสุทธิ์โดยวิธีครอสตริค (cross streak) ลากบนอาหาร yeast extract–malt extract agar จนได้เชื้อ โคลินี่เดี่ยวและเก็บเชื้อที่มีความบริสุทธิ์แล้วลงในอาหารเลี้ยง yeast extract–malt extract agar นำเชื้อที่แยกได้มาวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่ผนังเซลล์ (3.10.2) ซึ่งจะเลือกแต่เชื้อที่มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิ-เมลิกชนิดแอลแอล (LL-diaminopimelic acid หรือ meso-diaminopimelic acid) เท่านั้นมาทำการทดลองขั้นต่อไป

### 3.7 วิธีการเก็บรักษาแอกติโนมัยซีท

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทบริสุทธิ์เลี้ยงบนอาหาร soil extract agar medium บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 28 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ทำการตัดเก็บชิ้นวุ้นที่มีโคลินี่เชื้อลงในกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และทำการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อทุกปี

### 3.8 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้มาศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ โดยศึกษาลักษณะต่างๆ ดังนี้

#### 3.8.1 การศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์

##### 3.8.1.1 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อ

ทำการขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหาร soil extract medium (ภาคผนวก ก) ทึบแผ่นแก้วชุปแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ผ่านเปลวไฟ รอจนกระทั่งแผ่นแก้วเย็นแล้วจึงป้ายบนอาหารให้เอียง 45 องศาเซลเซียส (simple inclined cover slip) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ถึง 28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์บนแผ่นแก้ว ตรวจสอบคุณลักษณะสปอร์และการสร้างเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40X นอกจากนี้ทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อที่น่าสนใจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.8.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท

ทำการตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยการเลี้ยงบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆ โดยการขีดเชื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมตัดกัน (crosshatch streak) ตรวจสอบโดยดูการเจริญ สีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่าง และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

### 3.8.1.3 การศึกษาลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

#### (1.) การใช้แหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารพื้นฐาน (basal agar medium, ISP9) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ที่เติมกรดคาซามิโน (casamino acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบมีดังต่อไปนี้คือ น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol) น้ำตาลดี-ไรโบส (D-ribose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-เมลลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลดี-แรฟฟิโนส (D-raffinose) กลีเซอรอล (glycerol) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลแอล-แรมโนส (L-rhamnose) ดี-ซาลิซิน (D-salicin) น้ำตาลเบต้า-แลคโตส ( $\beta$ -lactose) น้ำตาลดี-กาแลคโตส (D-galactose) น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) น้ำตาลดี-เซลลูโลส (D-cellobiose) และน้ำตาลดี-ฟรุคโตส (D-fructose)

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาขีคบนอาหารแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อกับชุดควบคุมเชิงลบ เชื้อที่เจริญบนอาหาร basal agar ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวกคือเชื้อที่เจริญบนอาหาร basal agar ที่เติมน้ำตาลดีกลูโคส (D-glucose)

#### ทำการตรวจผลดังนี้

ก. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบ ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และอาหาร basal agar ที่มีการเติมน้ำตาลดีกลูโคสให้บันทึกผลเป็นบวก (+)

ข. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบ ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารสูตร basal agar ที่มีการเติมน้ำตาลดีกลูโคสให้บันทึกผลเป็นการเจริญเติบโตปานกลาง (+)

ค. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบ ได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนให้บันทึกผลเป็นลบ (-)

#### (2.) ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาขีคบนอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salts-starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน นำสารละลายไอโอดีนลาควินอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งในอาหารได้จะปรากฏบริเวณใสรอบโคโลนี

## (3.) ความสามารถในการย่อยเจลาติน

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวสูตรบูลเลียน เจลาติน (bouillon gelatin broth) (ภาคผนวก ก) (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน วัดผลโดยการนำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

## (4.) ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเปปโทน-โพแทสเซียมไนเตรต (peptone KNO<sub>3</sub>) (ภาคผนวก ก) : (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) 2 หยด และสารละลายไดเมทิลเนปทิลลามีน (*N,N*-dimethyl-1-naphthylamine) 3 หยด หากมีการเปลี่ยนรูปไนเตรตเป็นไนไตรต์สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

## (5.) ความสามารถในการย่อยโปรตีน

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารสกิน มิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้อาหารจะมีลักษณะใส

(6.) ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในระดับต่างๆ

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาจัดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตของเชื้อ

## (7.) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาจัดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญเติบโต

(8.)

ความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน นำเชื้อแอสคิโนมัยซีทมาจัดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีการปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญเติบโต

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ทั้งหมดแล้วจะสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็นกลุ่มๆ จากนั้นนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มไปทดสอบลักษณะอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางจีโนไทป์ต่อไป

### 3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของเซลล์

#### 3.9.1 การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมชนิดที่พบในอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เชื้อเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร yeast extract–malt extract broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง นำเซลล์ที่เก็บได้ไปเก็บไว้ในเครื่องทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน ก่อนนำไปทำระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) นำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

#### 3.9.2 การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP)

ตรวจสอบลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์ของเชื้อ โดยการสลายเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล (6N HCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วนำมาแยกตะกอนออก นำส่วนที่เป็นสารละลายไปทำให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสภาวะสูญญากาศที่ 60 องศาเซลเซียส ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปจุด (spot) บนแผ่น cellulose TLC ขนาด 10X10 เซนติเมตร (no. 5716) นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของเมทานอล-น้ำ-กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล-ไพริดีน (methanol-water-6N HCl-pyridine) ในอัตราส่วน 80:26:4:10 ปล่อยให้แห้งในตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่น เป่าให้แห้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (0.5% ninhydrin solution) ในอะซิโตน (acetone) ให้ทั่วทั้งแผ่น นำไปอบความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที ตรวจสอบแถบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพิเมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, 2546)

#### 3.9.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole-cell sugar)

ตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ โดยสลายเซลล์แห้ง 50 มิลลิกรัมด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นเติมสารละลายอิมิดของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $Ba(OH)_2$ ) ลงไปจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้มาเติมบิวทานอล 1 ถึง 2 หยด แล้วระเหยให้แห้งภายใต้สูญญากาศ เมื่อแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปจุดบนแผ่น cellulose TLC (no. 5716) นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในระบบตัวทำละลายผสมของบิวทานอล:น้ำกลั่น:ไพริดีน:โทลูอีน (toluene) อัตราส่วน 10:6:6:1 ปล่อยให้แห้งในตัวทำละลายเคลื่อนที่จนสุด

แผ่น เป่าให้แห้ง ทำซ้ำอีกครั้ง นำแผ่น TLC ที่แห้งแล้วมาพ่นด้วยสารละลายแอนนิลีน พทาเลท (aniline phthalate) ที่ประกอบด้วยกรดพทาลิก (phthalic acid) 3.25 กรัม บิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร แอนนิลีน (aniline) 2 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 5 ถึง 10 นาที เพื่อจุดจุดที่ เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard) (ชาญวิทย์ สุริยจักรกุล, 2546)

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่

1. ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส, แมนโนส, โซโลส และ แรมโนส

กลุ่มที่ 2. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และไรโบส

บริเวณที่ปรากฏแถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี 2 แบบ คือ แถบสีที่มีสีชมพูได้แก่น้ำตาลไรโบส, โซโลส และอะราบิโนส และแถบสีเหลืองได้แก่ แรมโนส, แมนโนส, กลูโคส และ กาแลคโตส

### 3.9.4 การวิเคราะห์ polar lipid

เตรียมสาร โพลาร์ลิปิด (polar lipid) ตามวิธีของ Minnikin และคณะ (1984) โดยการสกัดเซลล์แห้ง 150 มิลลิกรัม ด้วยเมทานอล - น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.3 อัตราส่วน 100:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง เติมนิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง นำสารส่วนล่างไปปั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (อัตราส่วน 90:100:30) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ ทำการสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (อัตราส่วน 50:100:40) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนใสไปรวมในหลอดทดลองข้างต้น นำส่วนใสที่ได้ไปสกัดต่อในชั้นคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนบนทิ้ง นำสารสกัดส่วนล่างไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำการวิเคราะห์ ฟอสโฟลิปิดโดยละลายสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล อัตราส่วน 2:1 และจุดสารตัวอย่างจุดลงบน silica TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10x10 cm) นำแผ่น PTLC ที่ได้มาทำการ Develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ในระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (65:25:4) และ คลอโรฟอร์ม-กรดอะซิติก (acetic acid)-เมทานอล-น้ำ (40:7.5:6:2) เมื่อแห้งแล้วนำไปปรนด้วยไอโอดีน แล้วพ่นด้วยสารละลายผสมดังนี้ (Minnikin, 1984)

(1.) Dittmer และ Lester สำหรับวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)

(2.) Ninhydrin อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE) และ OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE) (จุดสีชมพู)

(3.) Anisaldehyde อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิด และลิปิดอื่นๆ (จุดสีเหลืองอมเขียว)

(4.) Dragendorff ใช้สำหรับวิเคราะห์ Phosphatidylcholine (PC) (จุดสีส้ม)

### 3.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาจัดเป็นเส้นยวบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบมาจัดตั้งจากให้ชนิดโคโลนีของแอกติโนมัยซีท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (Rheims *et al.* 1999) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตรวจสอบได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทและเชื้อทดสอบ

### 3.11 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA base composition)

#### 3.11.1 การแยกดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตร glucose-yeast extract (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเก็บเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย TE buffer (100 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA (pH8.0)) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และไลโซไซม์ (lysozyme) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง เติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล-แอลกอฮอล์ (isoamylalcohol) ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่า 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (ส่วนใส) ใส่ในหลอดทดลอง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลที่เย็น (cold ethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งให้ดีเอ็นเอแห้ง นำไปละลายในสารละลาย TE buffer (100 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA (pH8.0)) ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

และโปรตีน ด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมง และเอนไซม์โปรตีนเอส เค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมง ทำการเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส (Yukphan, 2006)

### 3.12 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีน 16S rDNA บนสายดีเอ็นเอและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

#### 3.12.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA โดยใช้ universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA thermal cycler โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Yukphan *et al.*, 2005)

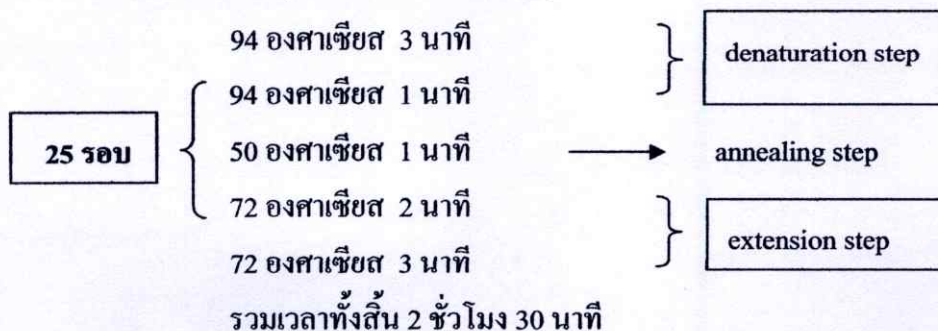
	ความเข้มข้น	ปริมาตร
<b>ไพรเมอร์ (primer)</b>		
20F	10 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร (pmol/μl)	4.0 ไมโครลิตร
1500R	10 พิโคโมลาร์ต่อไมโครลิตร (pmol/μl)	4.0 ไมโครลิตร
<b>ดีเอ็นทีพี (dNTP)</b>	2.0 ไมโครโมลาร์	10.0 ไมโครลิตร
<b>10X Taq buffer</b>	10 เท่า	10.0 ไมโครลิตร
<b>แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>)</b>	25.0 ไมโครโมลาร์	8.0 ไมโครลิตร
<b>Taq DNA Polymerase</b>	5 หน่วยต่อไมโครลิตร (Unit/ μl)	0.5 ไมโครลิตร
<b>น้ำปราศจากไอออน</b>	-	59.5 ไมโครลิตร
<b>ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template)</b>	100-200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	4.0 ไมโครลิตร
<b>รวม</b>		100.0 ไมโครลิตร

#### ไพรเมอร์

20F : GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

1500R : GTT ACC TTG TTA CGA CTT

วงจรมีชีอาร์ (โปรแกรม: 16S rDNA)



### 3.12.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วงยีน 16S rDNA บนสายดีเอ็นเอ

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่วง 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit (applied biosystem) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Yukphan และคณะ, 2005)

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

#### ไพรเมอร์

20F_16S	:	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
520F_16S	:	CAG CAG CCG CGG TAA TAC
520R_16S	:	GTA TTA CCG CGG CTG CTG
920F_16S	:	AAA CTC AAA TGA ATT GAC GG
920R_16S	:	CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT
1500R_16S	:	GTT ACC TTG TTA CGA CTT

โปรแกรม: Big\_dye

96 องศาเซียส 3 วินาที	}	25 รอบ
96 องศาเซียส 10 วินาที		
50 องศาเซียส 5 วินาที		
60 องศาเซียส 4 นาที		

### 3.12.3 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software (ในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.4 package (www.megasoftware.net/) (Yukphan *et al.*, 2005)

### 3.13 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทอย่างละเอียด

เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานทั้งด้านฟีโนไทป์ จีโนไทป์ และจีโนไทป์ข้างต้นทำให้สามารถบอกแนวโน้มนักลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทคร่าวๆ ได้จึงนำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีแนวโน้มน่าสนใจมาเป็นสปีชีส์ใหม่มาทำการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทอย่างละเอียดด้วยลักษณะดังต่อไปนี้

#### 3.13.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีเพิ่มเติม

##### 3.13.1.1. การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

นำเซลล์แห้ง 100 ถึง 500 มิลลิกรัมมาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม-เมทานอล อัตราส่วน 2:1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่มีค จากนั้นนำมากรองและทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ละลายซ้ำด้วยอะซิโตน (acetone) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้มาจุดบนแผ่น silica gel TLC (no. 1.05715 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm) เป็นแถบยาว 5 เซนติเมตร นำไปจุ่มในตัวทำละลายเบนซีน (benzene) ตรวจสอบแถบเมนาควิโนน (menaquinone) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำการจุดบริเวณเมนาควิโนนใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วยอะซิโตน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการกรองและนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้เมทานอล-โพรพานอล (2-propanol) อัตราส่วน 2:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ให้อัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (Komagata และ Suzuki, 1987)

##### 3.13.1.2. การวิเคราะห์เอซิลไทป์ (acyl type)

ชั่งเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ใส่ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปในคอลัมน์ (column) ที่มีความสูง 5 เซนติเมตร ที่ภายในบรรจุด้วย Dowex (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ทำการชะด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ชะอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล หลังจากนั้นเติมสารละลาย DON (DON reagent) และกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 2 นอร์มอล หากสารที่ทดสอบมีกรดไกลโคลิคามูรามิก (glycolylmuramic acid) ในผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคน สารละลายที่ทำการทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (Komagata และ Suzuki, 1987)

##### 3.13.1.3. การวิเคราะห์กรดมัคโคลิก (mycolic acid)

สลายเซลล์แห้งปริมาณ 50 ถึง 200 มิลลิกรัม ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 10 ในเมทานอล ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล และสกัดด้วย เฮกเซน (n-hexane) หรือ ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 2 ครั้ง นำสารส่วนบนไปทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติมเบนซีน-เมทานอล:กรดซัลฟูริก

(benzene:MeOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) อัตราส่วน 10:20:1 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็น ทำการสกัดสารละลายด้วยการเติมน้ำและเฮกเซน ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เพื่อสกัดสารละลายอีกครั้งด้วยเฮกเซนนำสารละลายส่วนบนที่ดูดได้ใส่ร่วมกับสารในหลอดใหม่ นำไปทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารตัวอย่างด้วยเอิน-เฮกเซน นำไปจุดบนแผ่น Silica gel TLC นำแผ่น TLC ไปจุ่มในตัวทำละลายเอิน-เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์ (n-hexane:diethylether) อัตราส่วน 4: 1 นำแผ่น TLC ที่แห้งแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟูริก สังเกตจุดที่เกิดขึ้น (Komagata และ Suzuki, 1987)

#### 3.13.1.4. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)

เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน จากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography (Komagata และ Suzuki, 1987)

### 3.13.2 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนไทป์เพิ่มเติม

#### 3.13.2.1. การวิเคราะห์ปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content)

เตรียมนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ของดีเอ็นเอแต่ละไอโซเลต โดยนำดีเอ็นเอปริมาตร 15 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก คัมในน้ำเคือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในน้ำที่เย็นจัดเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายนิวคลีโอไซด์ พี1 (nuclease P<sub>1</sub>) ความเข้มข้น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมสารละลายอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ความเข้มข้น 2.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้แอมโมเนียมได-ไฮโดรเจนฟอสเฟต (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ร่วมกับอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) อัตราส่วน 20:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้อัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร (Yukphan, 2006)

#### 3.13.2.2 การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA Hybridization)

ก. การตรึงดีเอ็นเอลงในจานทดลอง (immobilization of DNA in microtiter plate)

หยดสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกให้ความร้อนจนเสื่อมสภาพ (heat-denatured DNA) 100 ไมโครลิตร (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อหลุม) ของสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain), ดีเอ็นเอควบคุม (control DNA) (calf thymus หรือ *Escherichia coli*) และดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการทดสอบ (unknown) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วทดสอบสารละลายดีเอ็นเอนั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปลอ่ยให้แห้งที่ 45-60 องศาเซลเซียส

ข. การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน (DNA probe labeling with photobiotin)

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอของสายพันธุ์มาตรฐาน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโฟโตไบโอติน (photobiotin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอดไฟ (sunlamp) 300 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบิวทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบิวทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วไปต้มในน้ำเคือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว และนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) นาน 10 วินาที และผสมกับสารละลายดีเอ็นเอไฮบริดไคเซชัน (hybridization solution)

ค. ขั้นตอนก่อนไฮบริดไคเซชัน (prehybridization)

หยดสารละลายฟรีไฮบริดไคเซชัน (pre-hybridization) ลงแต่ละหลุมของจาน (plate) บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับการไฮบริดไคซ์ (hybridize) แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

ง. การไฮบริดไคเซชัน (hybridization)

หยดสารละลายที่ผสม DNA probe ของสายพันธุ์มาตรฐานลงแต่ละหลุม ปิดจานด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 15-18 ชั่วโมง แล้วทิ้งสารละลายนี้

จ. การตรวจสอบการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (detection of biotinylated-DNA annealing to immobilized-DNA)

เมื่อเทสารละลายไฮบริดไคซ์ (hybridize) ทิ้งแล้วล้างด้วยสารละลายซาลิน-โซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.2 เท่า (0.2xSSC) 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (bovine serum albumin (fraction V), triton X-100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลาย I ทิ้ง

วิธีวัดความเข้มของสี (colorimetric method) : เติมสารละลายสเตรปตาวิดิน เปรอร์ออกซิเดส (streptavidin peroxidase) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate-buffered saline, PBS) กับสารละลายโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate-buffered saline, PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายเตตระเมทิลเบนซิดีนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (tetramethyl benzidine -  $H_2O_2$ ) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วยไมโครเพลท ริดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 2 โมลาร์ (2M  $H_2SO_4$ ) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มของสีที่ 450 นาโนเมตร จะได้ค่าที่ต้องการ

การคำนวณการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ (homology %)= $(V_{\text{sample}} - V_{\text{control}} / V_{\text{type strain}} - V_{\text{control}}) \times 100$

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากเชื้อที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป (Yukphan, 2006)

### 3.14 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

#### 3.14.1 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทตัวแทนที่คัดเลือกข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร yeast extract-malt extract บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

#### 3.14.2 การสกัดสาร

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและตัวเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทิลอะซิเตต (ethyl-acetate) และ เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของเอทิลอะซิเตต (crude EtOAc extract) และ บิวทานอล (crude BuOH extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยแบ่งสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

#### 3.14.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) (Lorian, 1980)

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar disc diffusion ซึ่งอาศัยหลักการแพร่ของสิ่งสกัดออกมารอบแผ่นทดสอบที่วางบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงที่ได้ทำการทา (swab) เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231

โดยมีวิธีการ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งมูลเลอร์-ฮิลตัน (mueller-hilton agar, MHA) (ภาคผนวก ก) และซาบูราวด์ เด็กซ์โตส (sabouraud dextrose agar, SDA) (ภาคผนวก ก) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard no. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดสารละลายเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปราศจากการปนเปื้อน (aseptic technique) จากนั้นนำแผ่นดิสก์ (disc) ที่หดยสารละลายของสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (disc) (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่ และทำชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด ชุดควบคุมเชิง

บวก (positive control) โดยการใช้แผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะสำหรับเชื้อทดสอบนั้นๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของดิสก์ (disc) (inhibition zone)

### 3.14.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging method (Yamasaki, 1994)

3.14.4.1 เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical หรือ DPPH radical scavenging

เตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 1.6 มิลลิกรัมละลายในเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 อย่างรวดเร็ว จะได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เก็บให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.14.4.2 การทดสอบการทำปฏิกิริยา

นำสารสกัดหยาบในแต่ละส่วนที่สกัดมาเจือจางในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วง  $5 \times 10^{-1}$  ถึง  $5 \times 10^{-10}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายที่ได้แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และเคอร์เซทิน (quercetin) ที่ละลายในตัวทำละลายในเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

3.14.4.3 การคำนวณร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ทำการคำนวณโดยสมการต่อไปนี้

$$\%DPPH \text{ reduction} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลังจากทำการบ่ม

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่นำมาทำปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลังจากทำการบ่ม

สำหรับการประเมินค่า  $IC_{50}$  ของสารที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ทำได้โดยการเขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบเทียบกับร้อยละของการลดลงของ DPPH (%DPPH reduction) ที่ได้จากการคำนวณ จากนั้นหาค่า  $IC_{50}$  ได้เมื่อวิเคราะห์ผลจากกราฟ

### 3.14.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Skehan *et al.*, 1990)

ทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB (sulforhodamine B colorimetric method) โดยการนำมาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ african green monkey kidney fibroblast ในจานหลุมเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (well tissue culture plate) ปริมาณเซลล์แขวนลอยของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดสอบคือ  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้เอลลิปทิซิน (ellipticine) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบ ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบผลความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัดค่าของสีตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) วัดผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) โดยส่งสารตัวอย่างไปทดสอบที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์สัตว์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

### 3.15 สถานที่ทำการทดลอง

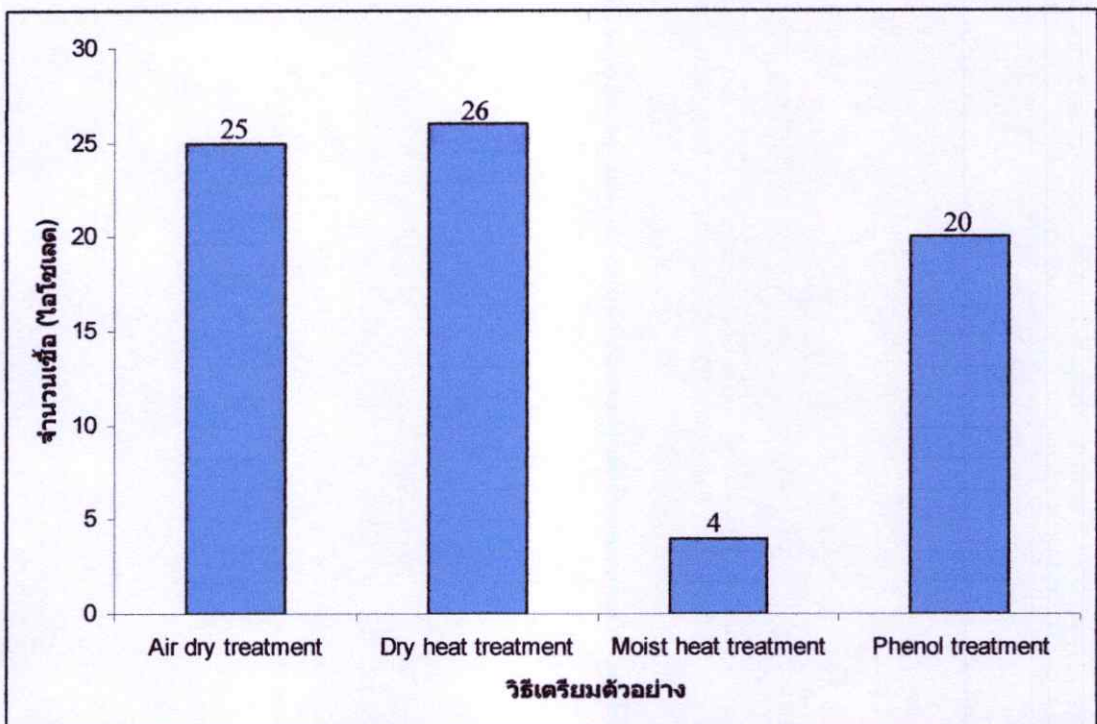
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการแยกและคัดเลือกรเชื้อแอกติโนมัยซีทหายาก

จากการเตรียมตัวอย่างดินด้วยวิธีการต่างๆ 4 วิธีคือ การเตรียมตัวอย่างโดยการผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air-drying treatment) การเตรียมตัวอย่างโดยการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (dried-heat treatment) การเตรียมตัวอย่างโดยการต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (moist-heat treatment) และการเตรียมตัวอย่างโดยใช้สารละลายฟีนอล (phenol-treatment) สามารถทำการคัดเลือกรเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากได้ 75 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงจำนวนของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากการเตรียมตัวอย่างดิน 4 วิธี

#### 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีท

##### 4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากที่คัดแยกได้จำนวน 75 ไอโซเลต มาทำการตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์โดยใช้ลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสามารถจัดกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 19 กลุ่มดังนี้

**กลุ่มที่ 1** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองและเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน สร้างสปอร์สีขาวอมเหลืองบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต แป้ง และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส ราฟิโนส อะราบิโนส เซลโลไบโอส และ ฟรุกโตส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลตได้แก่ MW4-27, MW7-26, MW8-7, MW 8-21 และ MW10-7



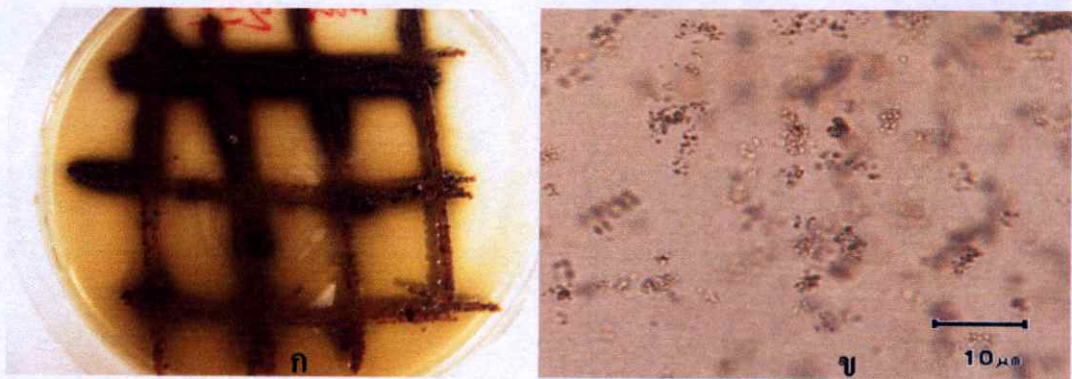
**รูปที่ 4.2** ก แสดงลักษณะ โคลนิจของเชื้อ ไอโซเลต MW8-21 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่ 2** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองซีด สร้างเส้นใยอากาศสีขาว บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เชื้อเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรด แป้ง และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้นไรโบส อะราบีโนส และไซโลส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW4-35, MW6-2 และ MW12-20



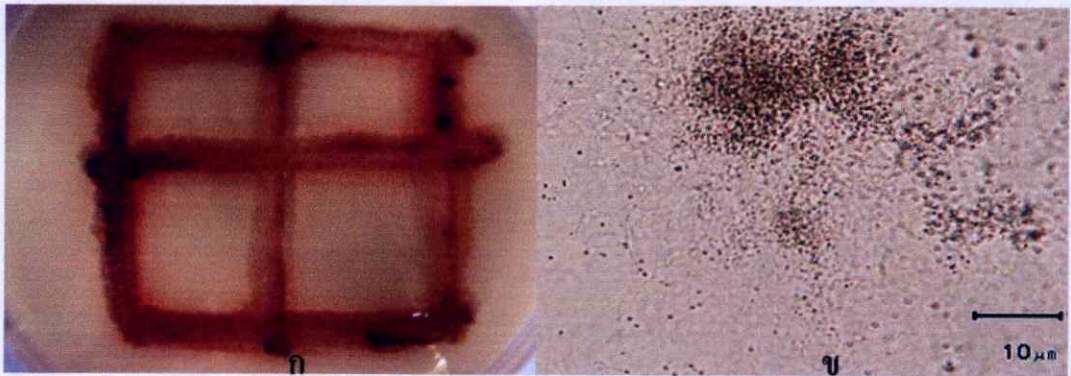
**รูปที่ 4.3** ก แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อ ไอโซเลต MW4-35 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่3** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้มเข้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ โคลินิจจะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อสร้างสปอร์บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน และย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตและโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลตได้แก่ MW1-2, MW2-5, MW2-24, MW3-5 และ MW10-14



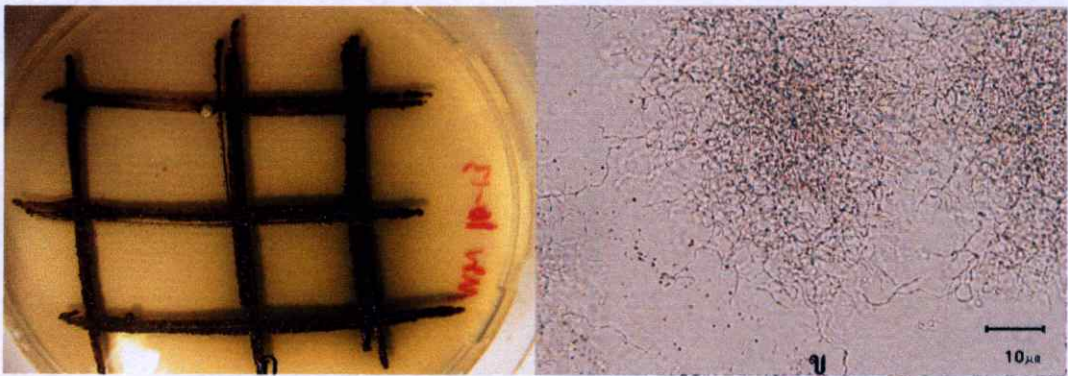
**รูปที่ 4.4** ก แสดงลักษณะ โคลินิจของเชื้อไอโซเลต MW2-5 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่4** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีแดงสว่าง ไม่สร้างเส้นใยอากาศ โคลินิเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มเมื่อสร้างสปอร์บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาตินย่อยแข็ง และ โปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรคได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส กลีเซอรอล ซาลิซิน และ โซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลตได้แก่ MW3-8, MW4-39, MW10-12 และ MW11-1



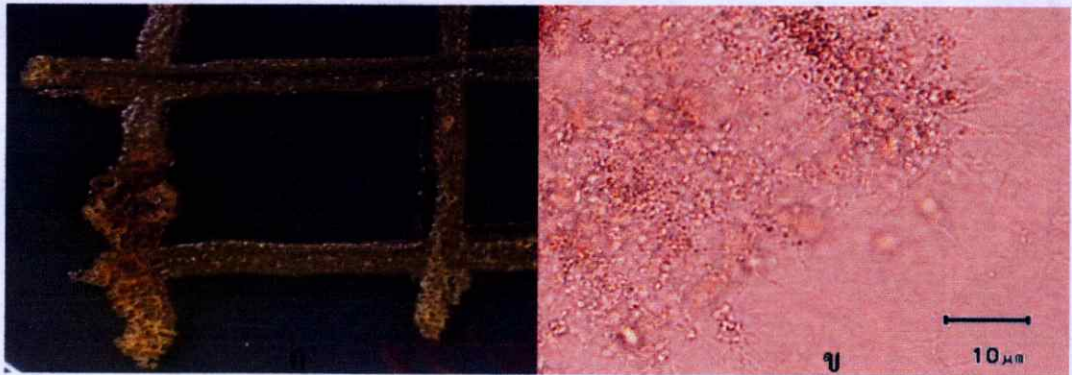
**รูปที่ 4.5** ก แสดงลักษณะ โคลินิของเชื้อ ไอโซเลต MW10-12 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

กลุ่มที่5 เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้มเข้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ โคลินิจะเปลี่ยนเป็นดำเมื่อสร้างสปอร์บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรต และย่อยโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส อะราบิโนส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW2-6, MW6-40 และ MW10-13



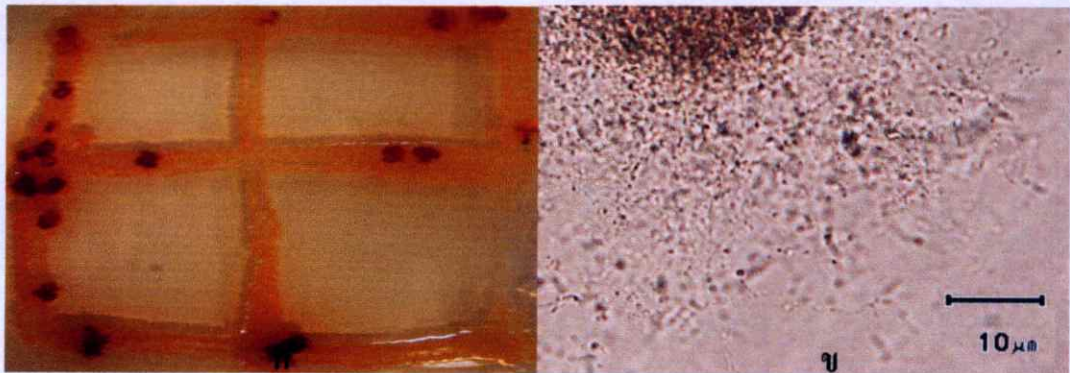
รูปที่ 4.6 ก แสดงลักษณะ โคลินิของเชื้อ ไอโซเลต MW10-13 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่ 6** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมแดงเทา ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างรงควัตถุสีม่วงเข้มบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน และย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตและย่อยโปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส แรมโนส อะราบิโนส และไซโลส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลตได้แก่ MW1-4, MW2-4, MW6-20, MW12-5 และ MW13-10



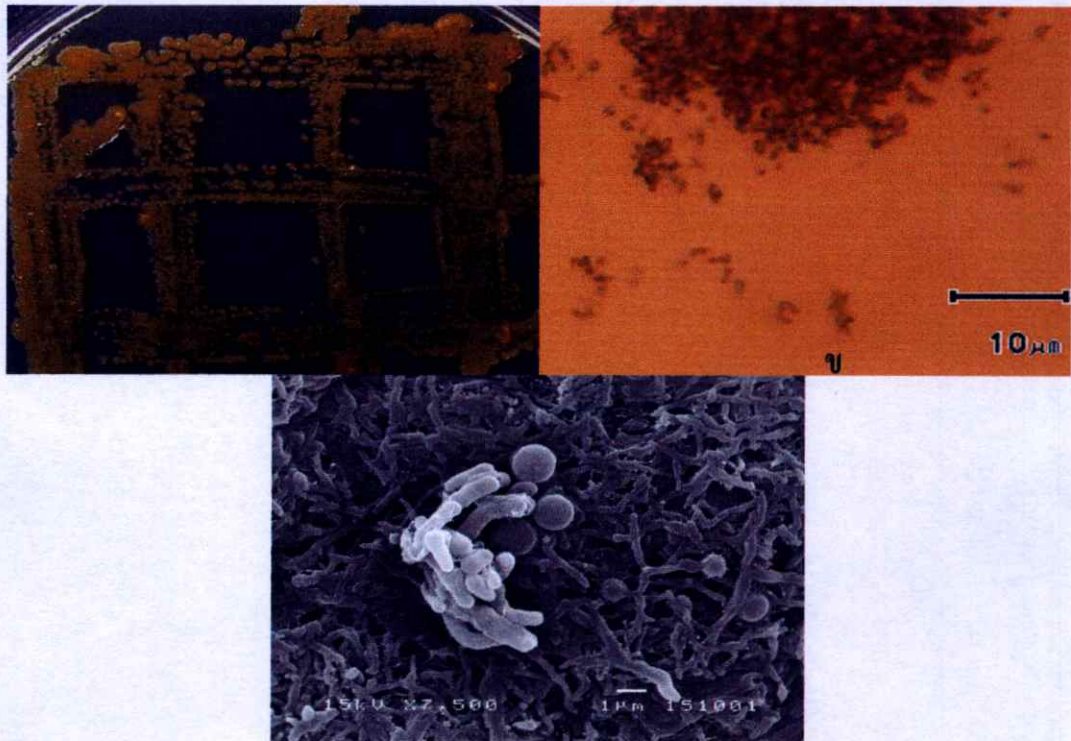
**รูปที่ 4.7 ก** แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW12-5 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
**ข** แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่ 7** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสี่เหลี่ยมอมส้มเข้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ โคโลนีเปลี่ยนเป็นแดงแก่เมื่อสร้างสปอร์บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้นไรโบส แรมโนส ฟรุกโตส และไซโลส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลตได้แก่ MW3-1, MW7-6, MW12-1 และ MW13-5



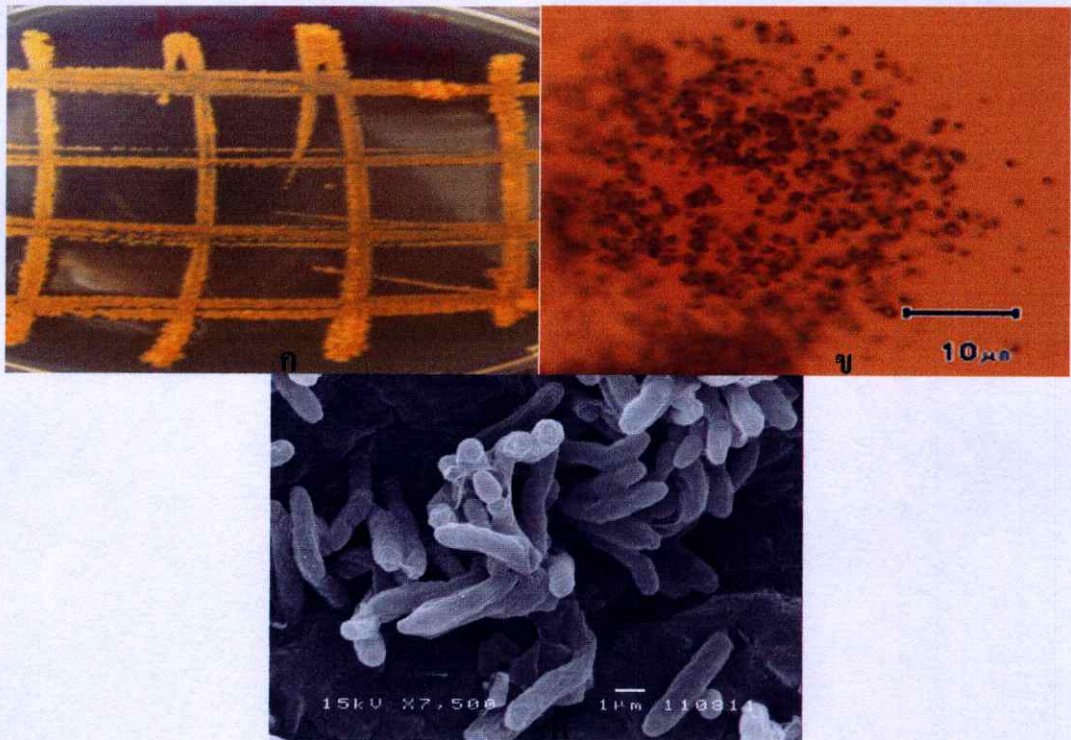
**รูปที่ 4.8** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW13-5 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่ 8** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-12 อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต ย่อยแป้ง และย่อยสลายโปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส เมลิไบโอส และอะราบิโนส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ MW1-12, MW2-25, MW6-35, MW6-46 และ MW13-6



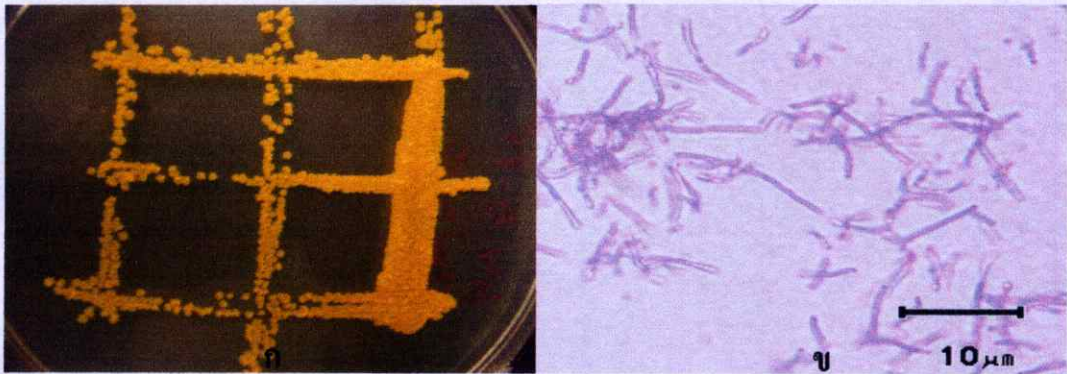
- รูปที่ 4.9** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW 2-25 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
 ค แสดงลักษณะของ globose bodies และสปอร์ของไอโซเลต MW2-25 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 7,500 เท่า)

**กลุ่มที่ 9** เป็นเชื้อแอกคิโนมายซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมเหลืองเข้ม ไม่เส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส เมลิไบโอส อะราบิโนส ซาลิซิน และไซโลส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW4-36, MW5-17 และ MW7-16



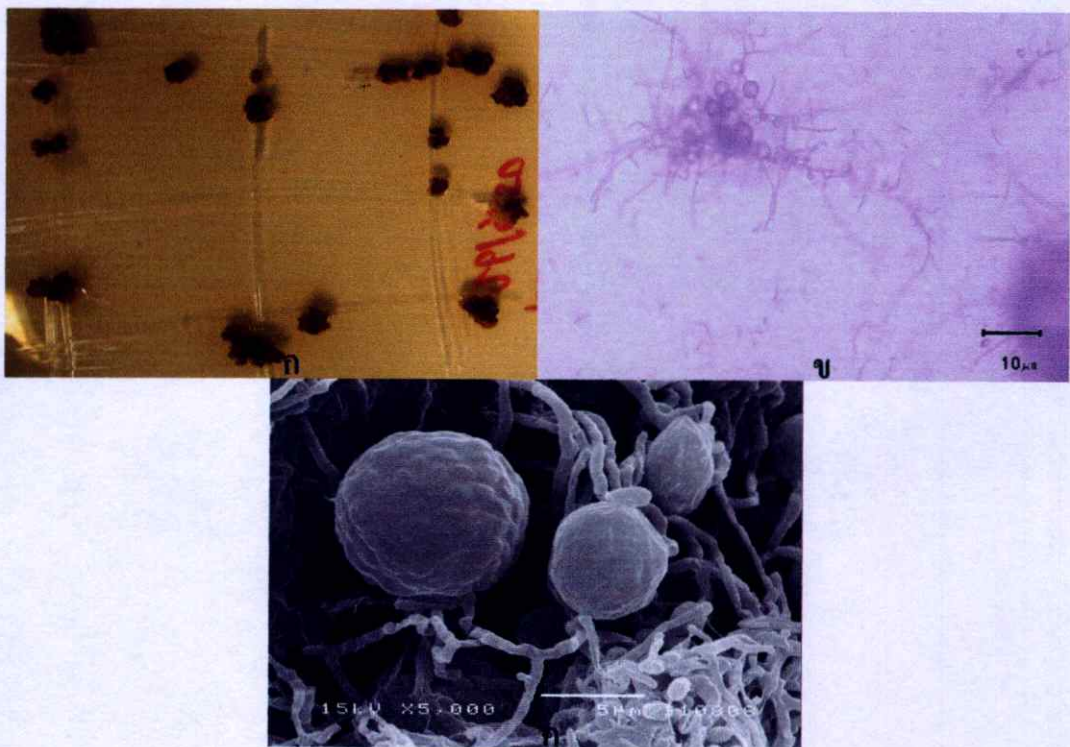
**รูปที่ 4.10** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW4-36 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
ค แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อไอโซเลต MW4-36 ด้วยใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 7,500 เท่า)

**กลุ่มที่10** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส และเมลิไบโอส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลตได้แก่ MW4-1, MW5-25, MW6-8 และ MW11-14



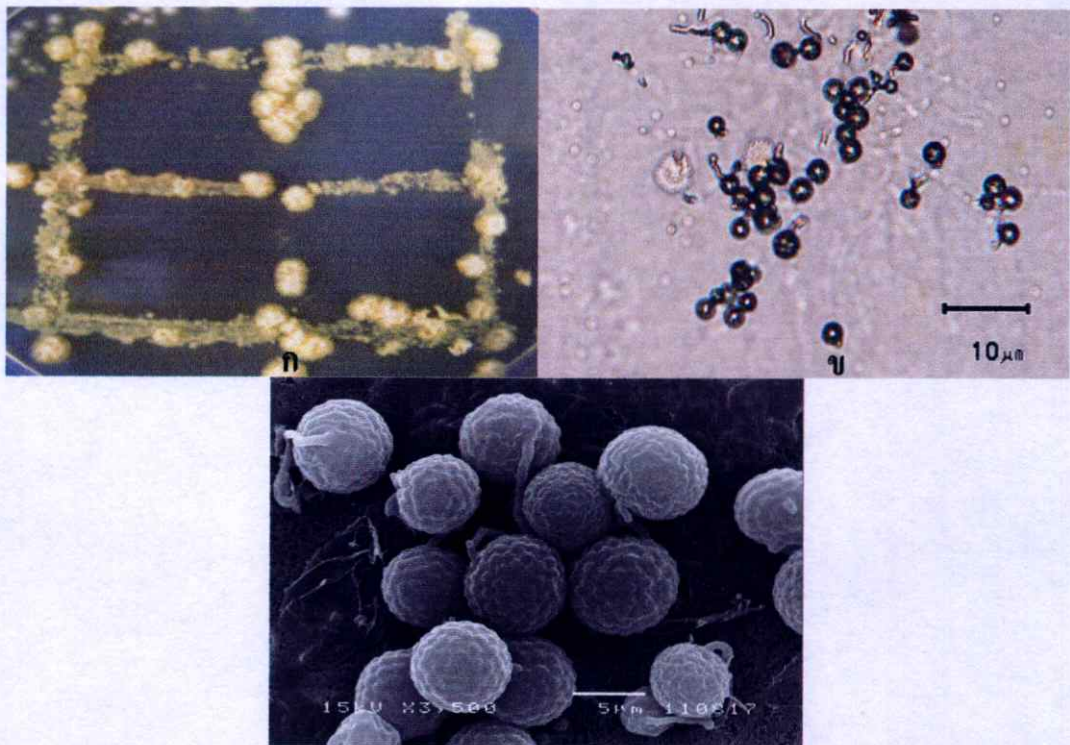
**รูปที่ 4.11** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW5-25 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่11** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีดําอมแดง ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส เมลิไบโอส กาแลคโตส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลตได้แก่ MW1-18, MW3-11, MW7-7 และ MW11-11



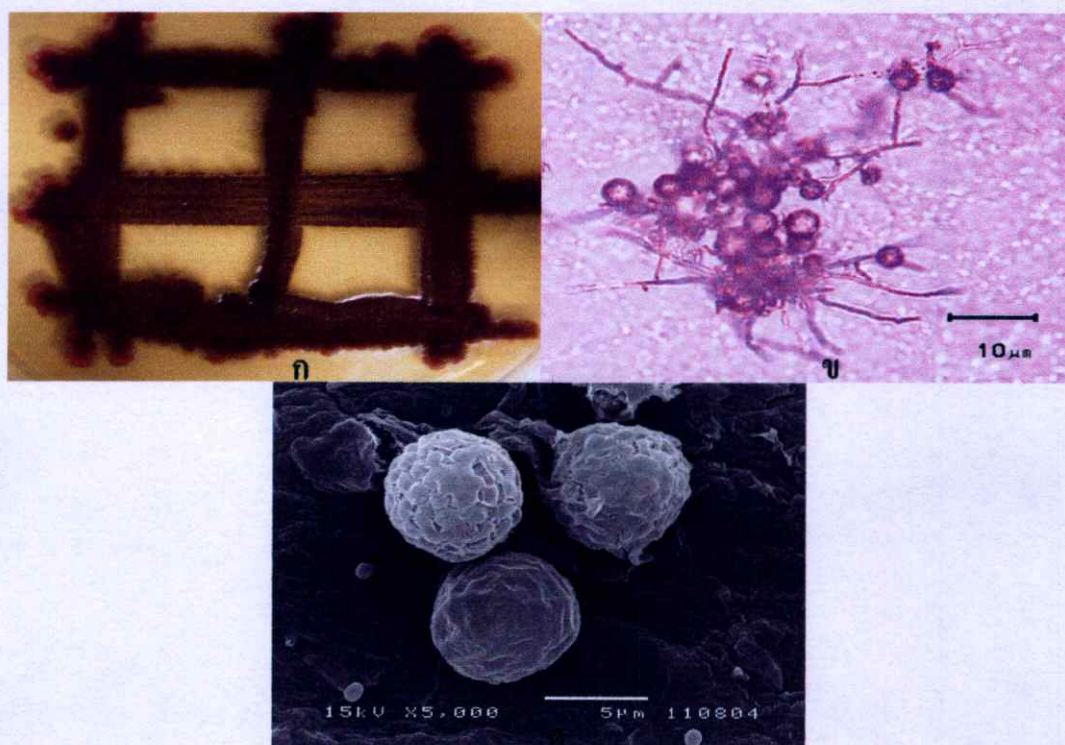
**รูปที่ 4.12** ก แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อไอโซเลต MW3-11 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
 ค แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อไอโซเลต MW3-11 ด้วยใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 5,000 เท่า)

**กลุ่มที่12** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียว ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น อะราบีโนส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW3-15, MW5-16, และ MW8-40



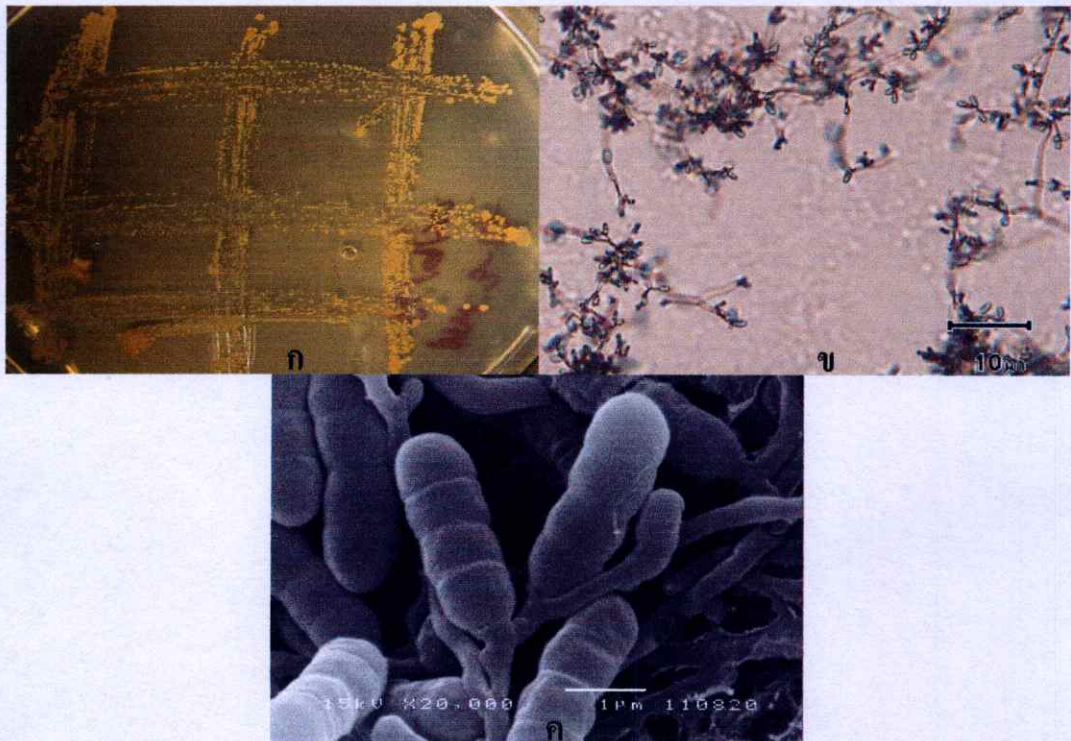
**รูปที่ 4.13** ก แสดงลักษณะ โคลิโคนิของเชื้อ ไอโซเลต MW5-16 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อ ระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
ค แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ ไอโซเลต MW5-16 ด้วยได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 3,500 เท่า)

**กลุ่มที่ 13** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีที่สร้างสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสีส้มอม น้ำตาลบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วง ความเป็นกรด-ด่างที่ 6-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดี ที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น แมนนิทอล เมลิไบโอส และฟรุกโตส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ MW4-45, MW5-8, MW5-9, MW7-20 และ MW12-13



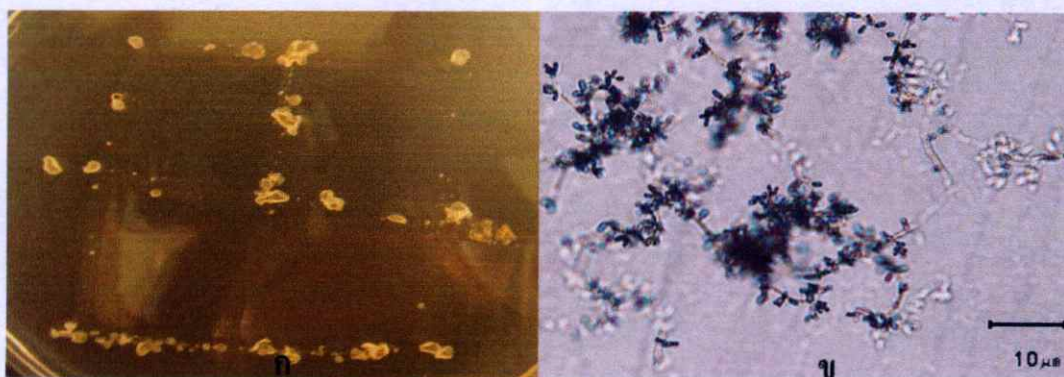
**รูปที่ 4.14** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW7-20 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อ ระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
 ค แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อไอโซเลต MW7-20 ด้วยได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 5,000 เท่า)

**กลุ่มที่14** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต ย่อยแป้ง และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น แมนนิทอล ไรโบส อะราบีโนส ฟรุกโตส และไซโลส (ตารางที่4.2)เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW3-17, MW10-3 และ MW13-13



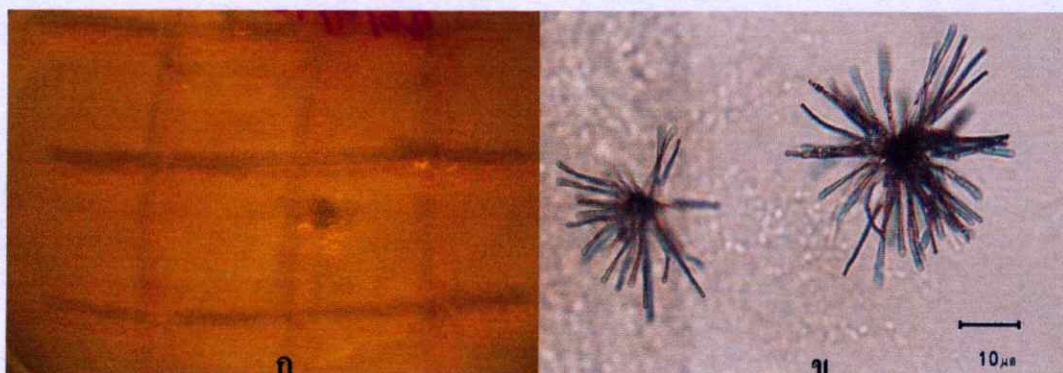
**รูปที่ 4.15** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW3-17 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)  
 ค แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อไอโซเลต MW3-17 ด้วยใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยายภาพ 10,000 เท่า)

**กลุ่มที่15** เป็นเชื้อแอสคิโนมัซิทที่สร้างเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และ โปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น แรมโนส และ กาลแลคโตส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลตได้แก่ MW2-29, MW7-23, MW8-55 และ MW10-19



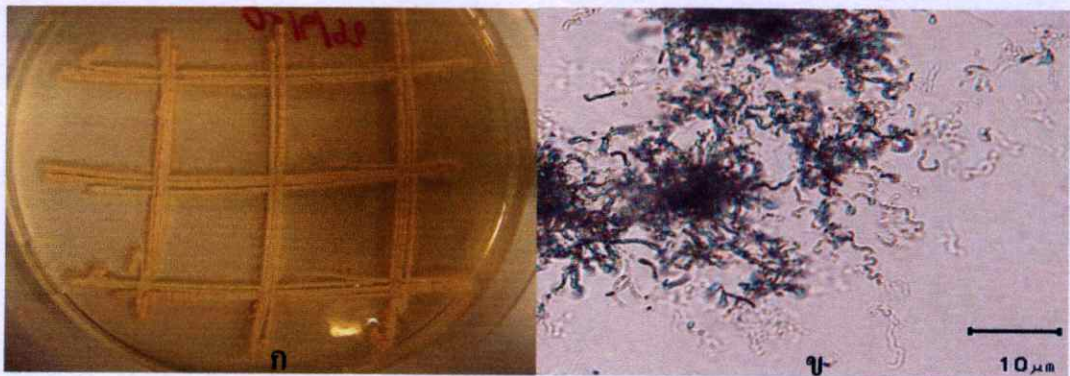
**รูปที่ 4.16** ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต MW7-23 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง  
 ระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่16** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแข็งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน ไนเตรต และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส แลคโตส กาแลคโตส อะราบิโนส ฟรุคโตส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ MW4-46, MW10-8 และ MW10-11



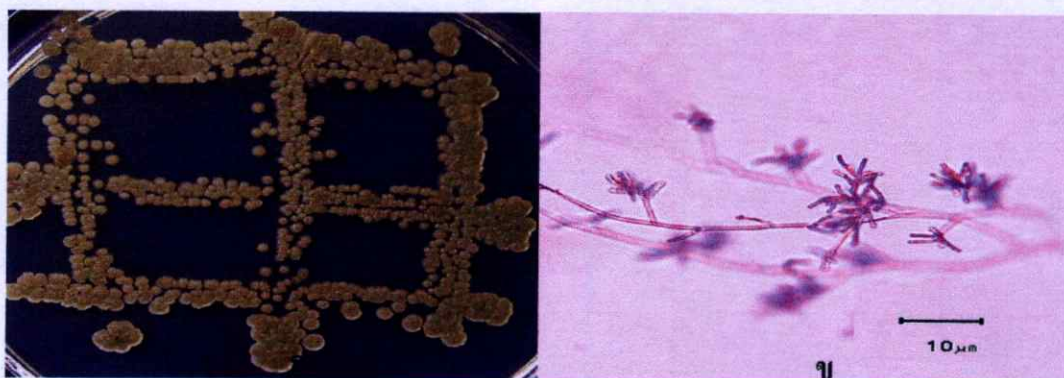
**รูปที่ 4.17 ก** แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อไอโซเลต MW10-11 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
**ข** แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ400 เท่า)

**กลุ่มที่17** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้มอ่อน เส้นใยอากาศสีชมพูอ่อน สร้างสปอร์สีขาวบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและไนเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ไรโบส, อะราบีโนส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 5 ไอโซเลตได้แก่ MW4-9, MW6-5, MW8-8, MW12-16 และ MW12-18



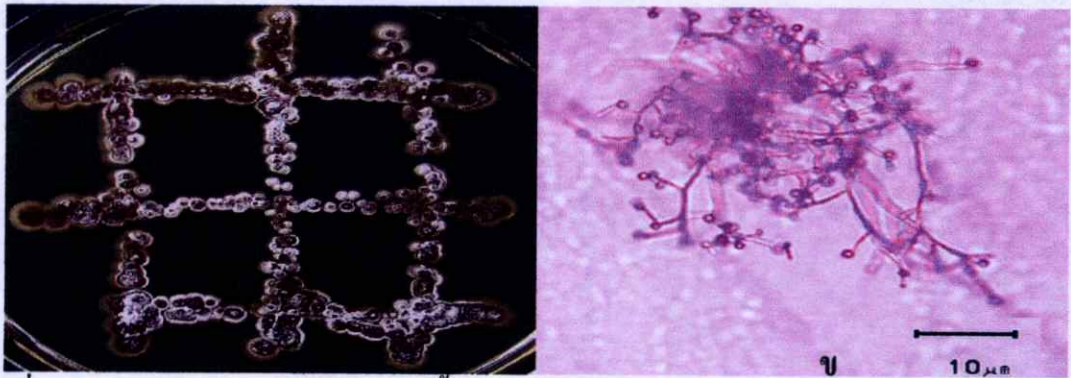
**รูปที่ 4.18** ก แสดงลักษณะ โคลินิของเชื้อไอโซเลต MW12-18 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่18** เป็นเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองดำ ไม่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แป้ง และโปรตีนในนมได้ (ตารางที่4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส แรมโนส อะราบีโนส และไซโลส (ตารางที่4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 ไอโซเลตได้แก่ MW1-15, MW6-17 และ MW7-30



**รูปที่ 4.19** ก แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อ ไอโซเลต MW1-15 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ต่อระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

**กลุ่มที่ 19** เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก เส้นใยอากาศสีน้ำตาลมะกอกอ่อน สร้างสปอร์สีขาวบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ระยะเวลา 14 วัน สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract–malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรต ย่อยแป้ง และย่อยโปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดยกเว้น ไรโบส แรมโนส แลคโตส อะราบิโนส ฟรุกโตส และไซโลส (ตารางที่ 4.2) เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ MW2-19, MW2-22, MW3-23 และ MW8-44



**รูปที่ 4.20** ก แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อ ไอโซเลต MW2-22 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน ข แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)







ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อเอคคิโนมีซีทาจากกลุ่มต่างๆ (ต่อ)

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)								ความเป็นกรด-ด่าง								อุณหภูมิ (°C)				Skim milk		การสลายเจลาติน	การละลายในกรด	การย่อยสลายแป้ง	กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์				
		1.5	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	+	-	+					-	+	-	+
10	MW4-1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	MW5-25	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	MW6-8	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	MW11-14	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11	MW1-18	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E.coli, M.luteus	B.subtilis	-	-
	MW3-11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E.coli, M.luteus	B.subtilis	-	-
	MW7-7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E.coli, M.luteus	B.subtilis	-	-
	MW11-11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E.coli, M.luteus	B.subtilis	-	-
12	MW3-15	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	MW5-16	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	MW8-40	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-





ตารางที่ 4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากกลุ่มต่างๆ

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน												
		D-Mannitol	D-Ribose	L-Rhamnose	D-Melibiose	D-Raffinose	Glycerol	Salicin	Lactose	D-Galactose	L-Arabinose	Cellobiose	D-Fructose	D-Xylose
1	MW4-27	+	-	±	±	-	+	±	±	+	±	+	±	±
	MW7-26	±	-	±	±	-	±	±	±	+	±	+	±	±
	MW8-7	±	-	±	±	-	+	+	±	±	±	+	±	±
	MW8-21	±	-	±	±	-	+	±	±	+	±	+	±	±
	MW10-7	±	-	±	±	-	+	±	±	+	±	±	±	±
2	MW4-35	±	±	+	±	+	+	+	±	+	±	±	±	±
	MW6-2	±	±	±	±	+	+	+	±	±	±	±	±	±
	MW12-20	±	±	+	±	+	+	+	±	+	±	±	±	±
3	MW1-2	+	-	±	+	±	+	±	±	±	±	+	±	+
	MW2-5	±	-	±	+	±	+	±	±	±	+	+	±	+
	MW2-24	±	-	±	+	±	+	±	±	±	+	±	±	+
	MW3-5	+	-	±	+	±	+	±	±	±	+	+	±	+
	MW10-14	±	-	±	±	±	+	±	±	±	+	±	±	+
4	MW3-8	±	-	-	+	-	-	-	±	+	+	±	±	+
	MW4-39	±	-	-	±	-	-	-	±	±	+	±	±	+
	MW10-12	±	-	-	±	-	-	-	±	+	+	±	±	+
	MW10-11	+	-	-	±	-	-	-	±	+	±	±	±	+
5	MW2-6	-	-	-	+	+	±	-	±	±	±	+	±	+
	MW6-40	-	-	-	+	±	±	-	+	+	±	±	±	+
	MW 10-13	-	-	-	+	+	±	-	+	+	±	+	±	+
6	MW1-4	±	-	-	±	±	±	±	±	+	+	±	±	+
	MW2-4	±	-	-	+	±	±	±	±	±	+	+	±	+
	MW6-20	±	-	-	±	±	+	±	±	+	+	+	±	+
	MW12-5	±	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+	±	+
	MW13-10	±	-	-	+	+	±	±	±	±	±	+	±	+
7	MW3-1	+	-	+	-	±	±	±	±	+	+	+	±	+
	MW7-6	±	-	+	-	±	±	±	±	+	+	±	±	+
	MW12-1	±	-	+	-	±	±	±	±	±	+	+	±	+
	MW13-5	±	-	+	-	±	±	±	±	+	+	+	±	+

ตารางที่ 4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากกลุ่มต่างๆ (ต่อ)

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน												
		D-Mannitol	D-Ribose	L-Rhamnose	D-Melibiose	D-Raffinose	Glycerol	Salicin	Lactose	D-Galactose	L-Arabinose	Cellobiose	D-Fructose	D-Xylose
8	MW1-12	±	-	+	-	+	+	±	±	+	-	+	±	+
	MW2-25	±	-	+	-	±	±	±	±	+	-	+	±	+
	MW6-35	±	-	+	-	±	±	±	±	+	-	±	±	+
	MW 6-46	±	-	+	-	±	±	±	±	+	-	±	±	+
	MW13-6	±	-	±	-	±	±	±	±	+	-	+	±	+
9	MW4-36	±	-	+	±	±	±	±	±	+	+	+	±	+
	MW5-17	±	-	+	±	±	±	±	±	±	+	+	±	+
	MW7-16	±	-	+	±	+	±	±	±	+	+	±	±	+
10	MW4-1	-	-	±	±	±	-	±	±	+	+	+	-	+
	MW5-25	-	-	+	±	±	-	±	±	+	+	+	-	+
	MW6-8	-	-	+	±	±	-	±	±	±	+	±	-	+
	MW11-14	-	-	+	±	+	-	±	±	+	±	+	-	+
11	MW1-18	±	-	+	-	±	±	-	+	-	±	+	±	-
	MW3-11	±	-	+	-	±	±	-	±	-	+	+	±	-
	MW7-7	+	-	+	-	±	±	-	±	-	±	±	±	-
	MW11-11	+	-	+	-	+	±	-	±	-	+	+	±	-
12	MW3-15	±	+	+	±	±	±	±	±	+	-	+	±	+
	MW5-16	+	+	+	±	±	±	±	±	±	-	+	±	+
	MW8-40	+	+	±	±	±	±	±	±	+	-	+	+	+
13	MW4-45	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-
	MW5-8	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	MW5-9	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	MW7-20	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-
	MW12-13	±	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	±	-
14	MW3-17	-	-	+	±	±	±	±	±	+	-	+	-	-
	MW10-3	-	-	±	±	±	±	±	±	+	-	+	-	-
	MW13-13	-	-	+	±	±	±	±	±	±	-	±	-	-
15	MW2-29	+	±	-	±	±	±	±	±	-	+	+	±	+
	MW7-23	±	+	-	±	±	±	±	±	-	+	+	±	+
	MW8-55	±	±	-	±	±	±	±	±	-	+	+	±	±
	MW10-19	±	+	-	+	±	±	±	±	-	+	+	±	±

ตารางที่ 4.2 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากกลุ่มต่างๆ (ต่อ)

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน												
		D-Mannitol	D-Ribose	L-Rhamnose	D-Melibiose	D-Raffinose	Glycerol	Salicin	Lactose	D-Galactose	L-Arabinose	Cellobiose	D-Fructose	D-Xylose
16	MW4-46	+	-	±	±	±	-	±	±	-	+	±	-	+
	MW10-8	±	-	+	±	±	-	±	+	-	+	+	-	±
	MW10-11	±	-	+	±	±	-	±	±	-	+	+	-	+
17	MW4-9	±	+	±	±	±	±	±	±	+	+	+	±	±
	MW6-5	±	+	+	±	+	±	±	±	+	+	+	±	+
	MW8-8	±	+	+	±	±	±	±	±	+	±	+	±	+
	MW12-16	±	+	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+
	MW12-18	±	+	+	±	±	±	±	±	+	+	+	±	+
18	MW1-15	+	-	+	±	±	+	±	+	±	+	+	±	+
	MW6-17	±	-	+	±	±	+	+	+	±	+	+	±	±
	MW7-30	±	-	+	±	±	+	±	±	±	+	+	±	+
19	MW2-19	±	-	±	+	±	±	±	±	+	±	±	-	±
	MW2-22	±	-	±	±	±	±	±	±	+	+	±	-	±
	MW3-23	±	-	±	±	±	±	±	±	±	+	±	-	±
	MW8-44	±	-	+	±	±	±	±	±	+	+	±	-	+

หมายเหตุ

+ = positive reaction

- = negative reaction

± = weakly reaction

#### 4.2.2 ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

##### 4.2.2.1 การวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนกลุ่มทั้ง 19 กลุ่มมาทำการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ พบว่ามี 1 กลุ่มที่มีชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ *LL-DAP* ซึ่งนอกจากจะเป็นลักษณะของแอคติโนมัยซีทในวงศ์สเตรปโตมัยซีตาซีอี (Family *Streptomycetaceae*) แล้วยังพบได้ในวงศ์อื่นอีกเช่น วงศ์นอคาร์ดีโออิดาซีอี (Family *Nocardioideaceae*) ส่วนอีก 11 กลุ่มมีชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ *meso-DAP* และ 7 กลุ่มมีชนิดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ *meso-DAP* และ *OH-DAP* ร่วมกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแอคติโนมัยซีทหายาก ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกในผนังเซลล์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	รหัส	ชนิดของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก(diaminopemilic acid type)		
		<i>meso-DAP</i>	<i>LL-DAP</i>	<i>OH-DAP</i>
1	MW 8-21	+	-	-
2	MW 4-35	-	+	-
3	MW 2-5	+	-	-
4	MW 10-12	+	-	-
5	MW 10-13	+	-	+
6	MW 12-5	+	-	+
7	MW 13-5	-	-	+
8	MW 2-25	+	-	+
9	MW 4-36	+	-	+
10	MW 5-25	+	-	+
11	MW 3-11	+	-	-
12	MW 5-16	+	-	-
13	MW 7-20	+	-	-
14	MW 3-17	+	-	-
15	MW 7-23	+	-	-
16	MW 10-11	+	-	+
17	MW 12-18	+	-	-
18	MW 1-15	+	-	-
19	MW 2-22	+	-	-

#### 4.2.2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell sugar)

จากการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole cell sugar) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากตัวแทนของแต่ละกลุ่มพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนกลุ่มที่ 1 และ 17 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม A คือพบน้ำตาลอะราบิโนสและกาแลคโตสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ภายในเซลล์ เชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนกลุ่มที่ 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, และ 19 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม B คือพบน้ำตาลมาคูโรสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ภายในเซลล์ เชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนกลุ่มที่ 2 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม C คือไม่มีรูปแบบของน้ำตาลเฉพาะ เชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทนกลุ่มที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 จัดเป็นชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์กลุ่ม D คือพบน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลเอกลักษณ์ภายในเซลล์ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ (whole cell sugar)

กลุ่ม	รหัส	ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์							
		Rhamnose	Ribose	Mannose	Arabinose	Galactose	Xylose	Glucose	Madurose
1	MW 8-21	+	+	-	+	+	-	+	-
2	MW 4-35	-	+	-	+	+	-	+	-
3	MW 2-5	+	+	-	+	+	+	+	-
4	MW 10-12	+	+	-	+	+	+	+	-
5	MW 10-13	+	+	-	+	+	+	+	-
6	MW 12-5	+	+	-	+	+	-	+	-
7	MW 13-5	+	+	-	+	+	+	+	-
8	MW 2-25	+	+	-	-	-	+	+	-
9	MW 4-36	+	+	-	+	-	+	+	-
10	MW 5-25	-	+	+	-	-	+	-	-
11	MW 3-11	-	+	+	-	-	-	+	+
12	MW 5-16	+	+	+	-	-	-	+	+
13	MW 7-20	+	+	-	-	-	-	+	+
14	MW 3-17	+	+	+	-	+	-	+	+
15	MW 7-23	-	+	-	-	+	-	+	+
16	MW 10-11	-	+	+	-	-	-	+	+
17	MW 12-18	-	+	-	+	+	-	-	-
18	MW 1-15	-	+	-	-	-	-	+	+
19	MW 2-22	-	+	-	-	-	-	+	+

#### 4.2.2.3 การวิเคราะห์โพลาร์ลิปิด (polar lipid)

การวิเคราะห์โพลาร์ลิปิด (polar lipid) ของแอสคิตโนมัยซีทหายากตัวแทนกลุ่มทั้ง 19 กลุ่ม พบรูปแบบของโพลาลิปิด (polar lipid) 3 รูปแบบคือ กลุ่มที่มีรูปแบบของโพลาลิปิด (polar lipid) ชนิดที่ 2 (phospholipid type II) คือมี phosphatidylethanolamine (PE) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์จำนวน 8 ไอโซเลต กลุ่มที่มีรูปแบบของโพลาลิปิด (polar lipid) ชนิดที่ 3 (phospholipid type III) คือมี phosphatidylcholine (PC) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์จำนวน 4 ไอโซเลต และกลุ่มที่มีรูปแบบของโพลาลิปิด (polar lipid) ชนิดที่ 4 (phospholipid type IV) คือมี phosphatidylethanolamine (PE) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์จำนวน 7 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงองค์ประกอบของโพลาร์ลิปิด (polar lipid) จากเชื้อตัวแทนกลุ่มแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	รหัส	ชนิดของโพลาลิปิด (polar lipid type)									
		DPG	PIMs	PI	PE	DGDG	OH-PE	GluNu	APG	PG	PC
1	MW 8-21	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
2	MW 4-35	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
3	MW 2-5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	MW 10-12	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	MW 10-13	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	MW 12-5	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
7	MW 13-5	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
8	MW 2-25	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
9	MW 4-36	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
10	MW 5-25	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
11	MW 3-11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
12	MW 5-16	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
13	MW 7-20	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
14	MW 3-17	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
15	MW 7-23	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
16	MW 10-11	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
17	MW 12-18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
18	MW 1-15	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
19	MW 2-22	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

PA = Phosphatidic acid

PC = Phosphatidylcholine

PE = Phosphatidylethanolamine

PS = Phosphatidylserine

PI = Phosphatidylinositol

PG = Phosphatidylglycerol

DPG = Diphosphatidylglycerol PIMs = Phosphatidylinositolmannosides

GluNu = An unknown structure containing glucosamine OH-PE = O H-phosphatidylethanolamine

**กลุ่มที่ 1** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type IV) (ตารางที่ 4.3) พบน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตสและไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด A) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่ 4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 3) (ตารางที่ 4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Pseudonocardia*

**กลุ่มที่ 2** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *LL* (cell wall type I) (ตารางที่ 4.3) พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด C) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่ 4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 3) (ตารางที่ 4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Kribbella*

**กลุ่มที่ 3** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II) (ตารางที่ 4.3) พบน้ำตาลแรมโนส กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่ 4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

**กลุ่มที่ 4** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II) (ตารางที่ 4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่ 4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่ 4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

**กลุ่มที่ 5** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่ 4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่ 4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2)

(ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

**กลุ่มที่6** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

**กลุ่มที่7** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

**กลุ่มที่8** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แรมโนส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Dactylosporangium*

**กลุ่มที่9** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แรมโนส อราบิโนส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Dactylosporangium*

**กลุ่มที่10** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลไซโลส แรมโนส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติล-

เอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และ ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Catellatospora*

**กลุ่มที่11** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type III) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไรโบส และมาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิดB) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptosporangium*

**กลุ่มที่12** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type III) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส แมนโนส ไรโบส มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และ ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptosporangium*

**กลุ่มที่13** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type III) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส ไรโบส และมาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิดB) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptosporangium*

**กลุ่มที่14** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type A1γ) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลไรโบส กลูโคส แรมโนส กาแลคโตส แมนโนส และมาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planotetraspora*

**กลุ่มที่15** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type A1γ) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ไรโบส และ มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติดิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4)

(ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Planotetraspora*

**กลุ่มที่16** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไรโบส มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และ ไคฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Herbidospora*

**กลุ่มที่17** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* (cell wall type IV) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลอะราบินโนส ไรโบส และกาแลคโตส (รูปแบบน้ำตาลชนิด-A) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และ ไคฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 2) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Nocardia*

**กลุ่มที่18** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* (cell wall type III) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และมาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Nonomuraea*

**กลุ่มที่19** ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* (cell wall type III) (ตารางที่4.3) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) (ตารางที่4.4) พบฟอสฟาติลิลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ) และ ไคฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟลิปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟลิปิดชนิดที่ 4) (ตารางที่4.5) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้จัดอยู่ในสกุล *Nonomuraea*

#### 4.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางจีโนมไทป์ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทตัวแทนในแต่ละกลุ่ม ได้ผลดังนี้

##### ตัวแทนกลุ่มที่ 1 เชื้อไอโซเลต MW8-21

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทไอโซเลต MW8-21 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Pseudonocardia kongjuensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.80 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 90 (รูปที่4.21)

##### ตัวแทนกลุ่มที่ 2 เชื้อไอโซเลต MW4-35

การวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทไอโซเลต MW4-35 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Kribbella jejuensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.90 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 51 (รูปที่4.22)

##### ตัวแทนกลุ่มที่ 3 เชื้อไอโซเลต MW2-5

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทไอโซเลต MW2-5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora rosaria* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.20 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 50 (รูปที่4.23)

##### ตัวแทนกลุ่มที่ 4 เชื้อไอโซเลต MW10-12

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทเชื้อไอโซเลต MW10-12 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ MW12-5, *Micromonospora chokoriensis* และ *Micromonospora saelicesensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.30 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 70, 70 และ 80 ตามลำดับ (รูปที่4.23)

##### ตัวแทนกลุ่มที่ 5 เชื้อไอโซเลต MW10-13

การวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสโคไมซีตโนมัยซีทไอโซเลต MW10-13 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora coxensis* มากที่สุดที่ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.70 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 71 (รูปที่4.23)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 6 เชื้อไอโซเลต MW12-5

การวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW12-5 พบว่าเป็นเชื้อเดียวกับ *Micromonospora chokoriensis* มีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 70 (รูปที่4.23)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 7 เชื้อไอโซเลต MW13-5

การวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW13-5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW12-5, *Micromonospora chokoriensis* และ *Micromonospora saelicesensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.60 (ภาคผนวก-ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 70, 70 และ 80 ตามลำดับ (รูปที่4.23)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 8 เชื้อไอโซเลต MW2-25

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต MW2-25 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Dactylosporangium aurantiacum* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.30 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 74 (รูปที่4.24)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 9 เชื้อไอโซเลต MW4-36

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต MW4-36 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW2-25 และ *Dactylosporangium aurantiacum* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.20 และ 98.9 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 74 และ 45 ตามลำดับ (รูปที่4.24)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 10 เชื้อไอโซเลต MW5-25

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW5-25 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Catellatospora citrea* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.30 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 90 (รูปที่4.25)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 11 เชื้อไอโซเลต MW3-11

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW3-11 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW7-20 และ *Streptosporangium amethystogenes* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.40 และ 99.20 (ภาคผนวก ง) ตามลำดับที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 และ 71 ตามลำดับ (รูปที่ 4.26)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 12 เชื้อไอโซเลต MW5-16

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW5-16 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptosporangium canum* และ MW3-11 มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.10 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 95 และ 84 ตามลำดับ (รูปที่ 4.26)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 13 เชื้อไอโซเลต MW7-20

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW7-20 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW3-11, MW5-16 และ *Streptosporangium amethystogenes* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.40, 98.80 และ 98.70 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84, 92 และ 71 ตามลำดับ (รูปที่ 4.26)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 14 เชื้อไอโซเลต MW3-17

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW3-17 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW7-23 และ *Planotetraspora mira* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.00 และ 98.90 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 52 และ 79 ตามลำดับ (รูปที่ 4.27)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 15 เชื้อไอโซเลต MW7-23

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยไอโซเลต MW7-23 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต MW3-17, *Planotetraspora silvatica* และ *Planotetraspora mira* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.00, 98.70 และ 98.70 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 90, 52 และ 79 ตามลำดับ (รูปที่ 4.27)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 16 เชื้อไอโซเลต MW10-11

การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยไอโซเลต MW10-11 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Herbidospora cretacea* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.50 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่4.28)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 17 เชื้อไอโซเลต MW12-18

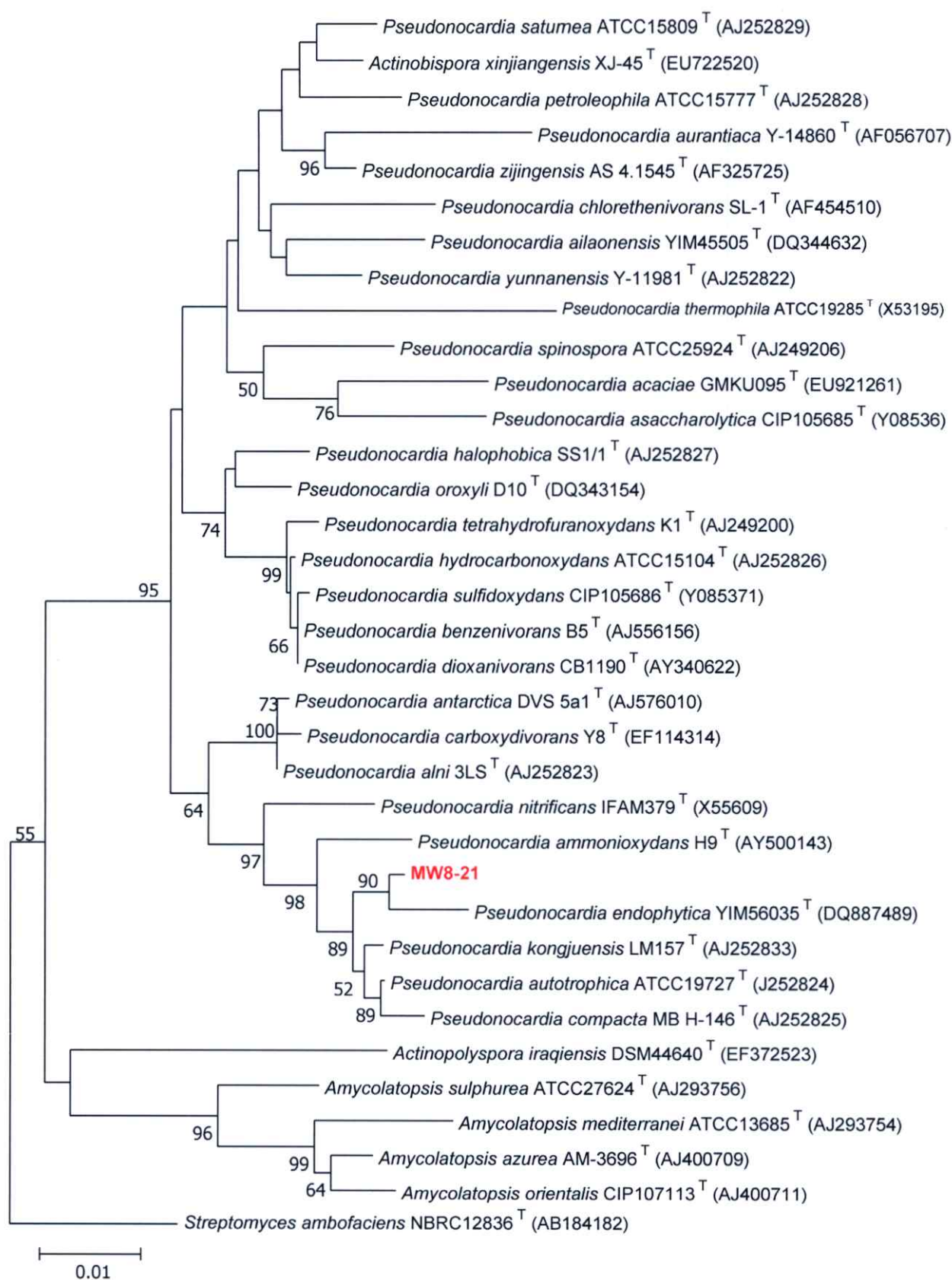
การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยไอโซเลต MW12-18 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Nocardia exalba* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.30 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 90 (รูปที่4.29)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 18 เชื้อไอโซเลต MW1-15

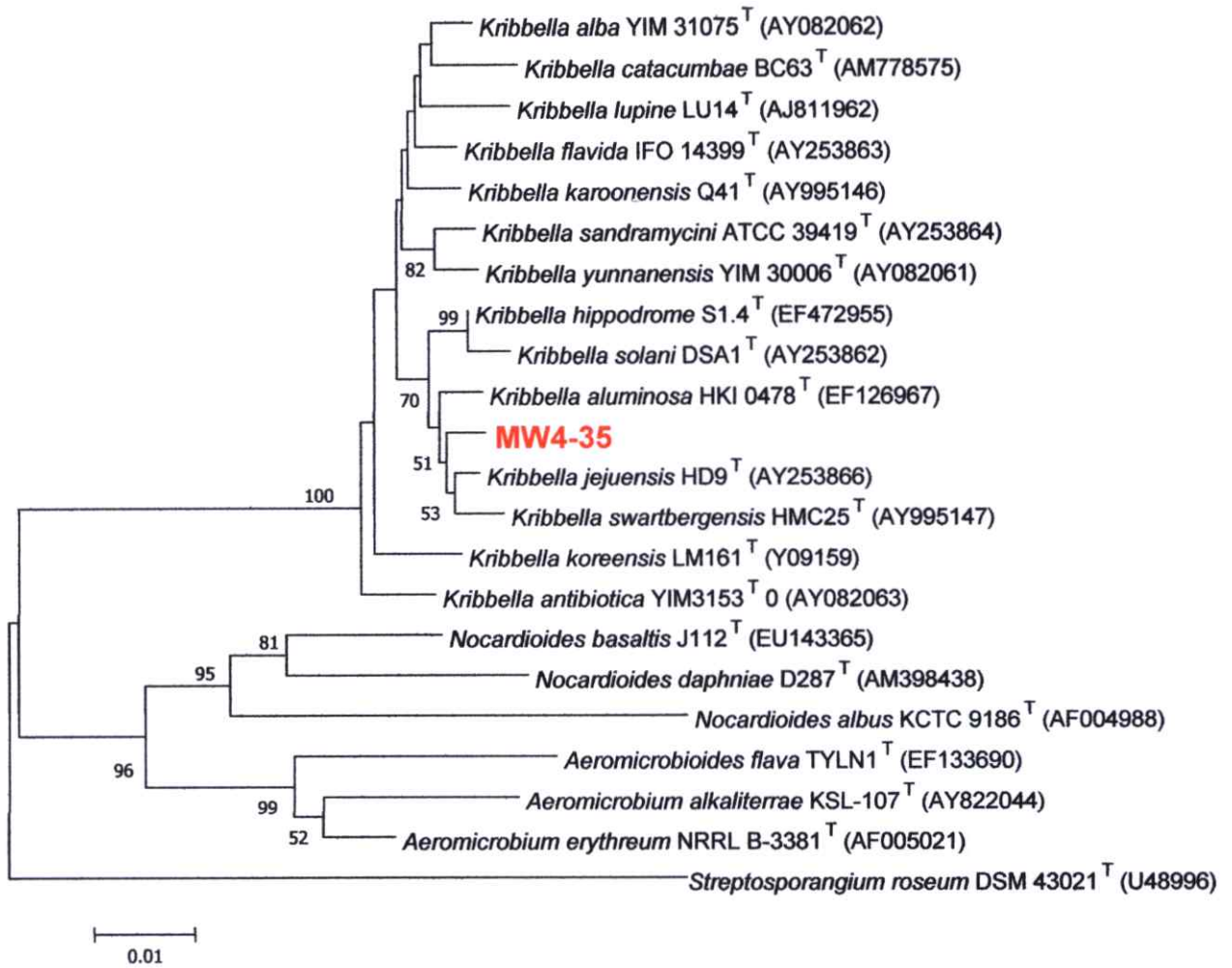
การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยไอโซเลต MW1-15 พบว่าเป็นเชื้อเดียวกันกับ *Nonomuraea spiralis* มีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 55 (รูปที่4.30)

### ตัวแทนกลุ่มที่ 19 เชื้อไอโซเลต MW2-22

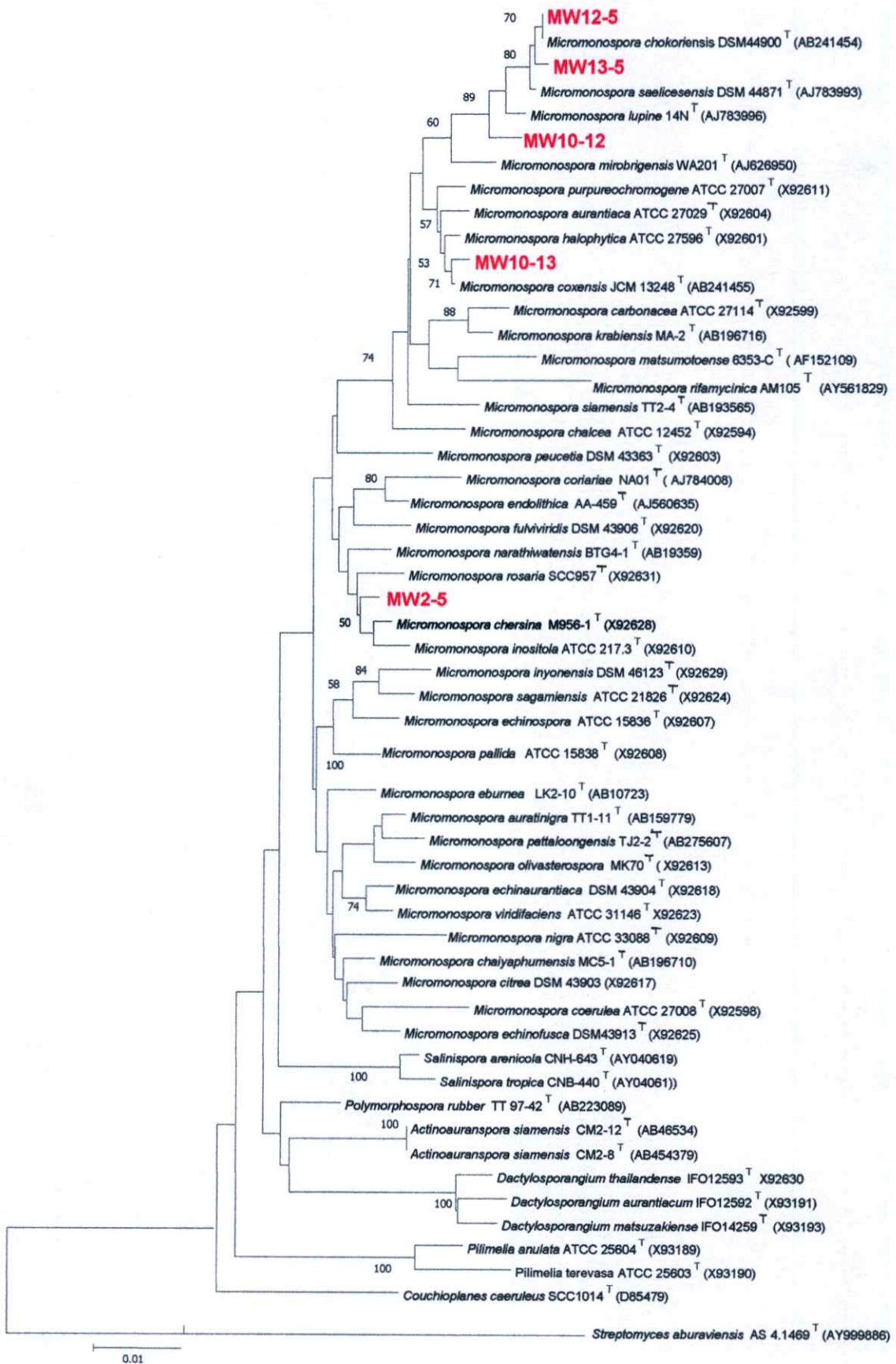
การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยไอโซเลต MW 2-22 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ MW1-15 และ *Nonomuraea spiralis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.10 (ภาคผนวก ง) ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 55 (รูปที่4.30)



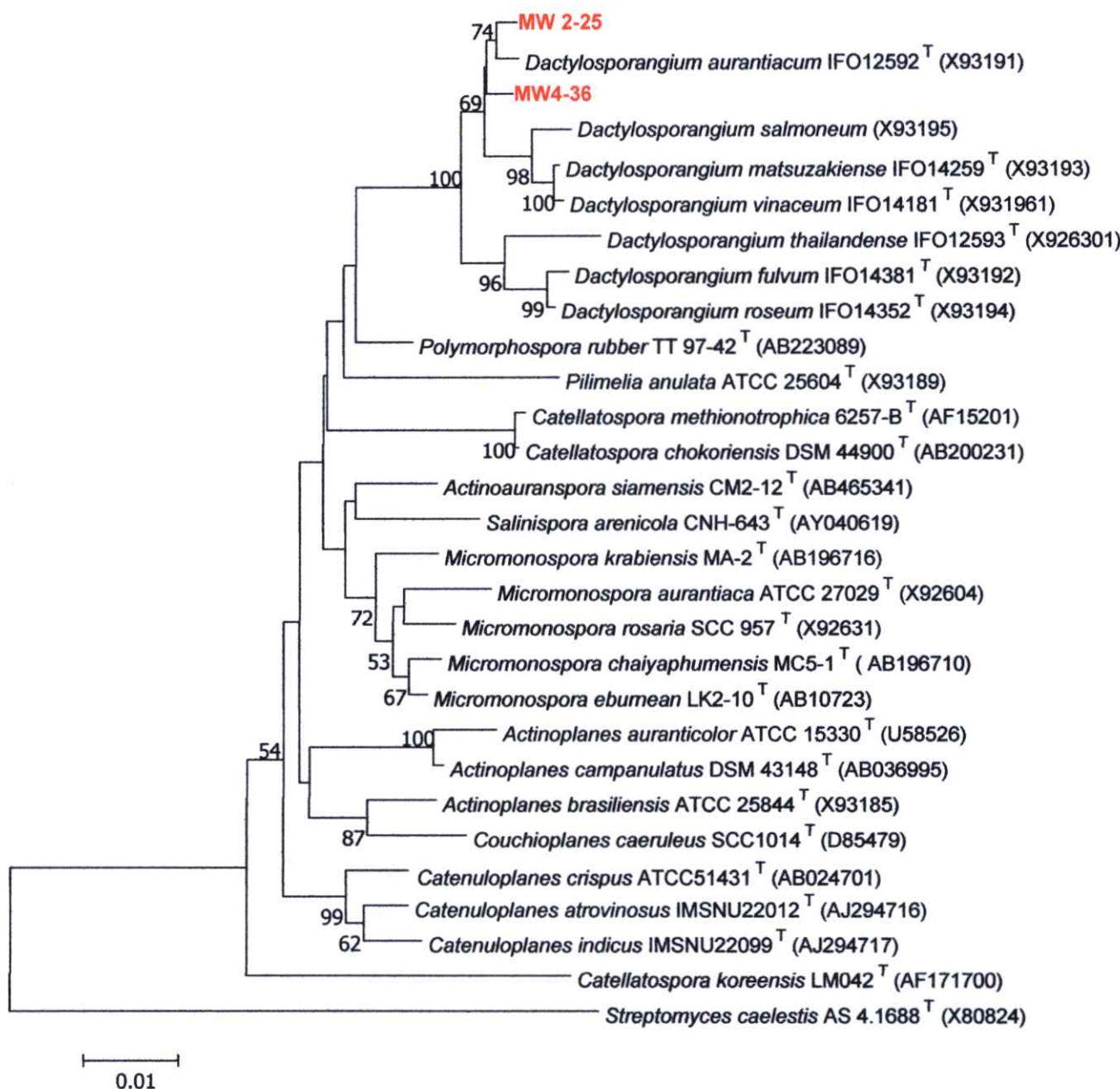
รูปที่ 4.21 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW8-21 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



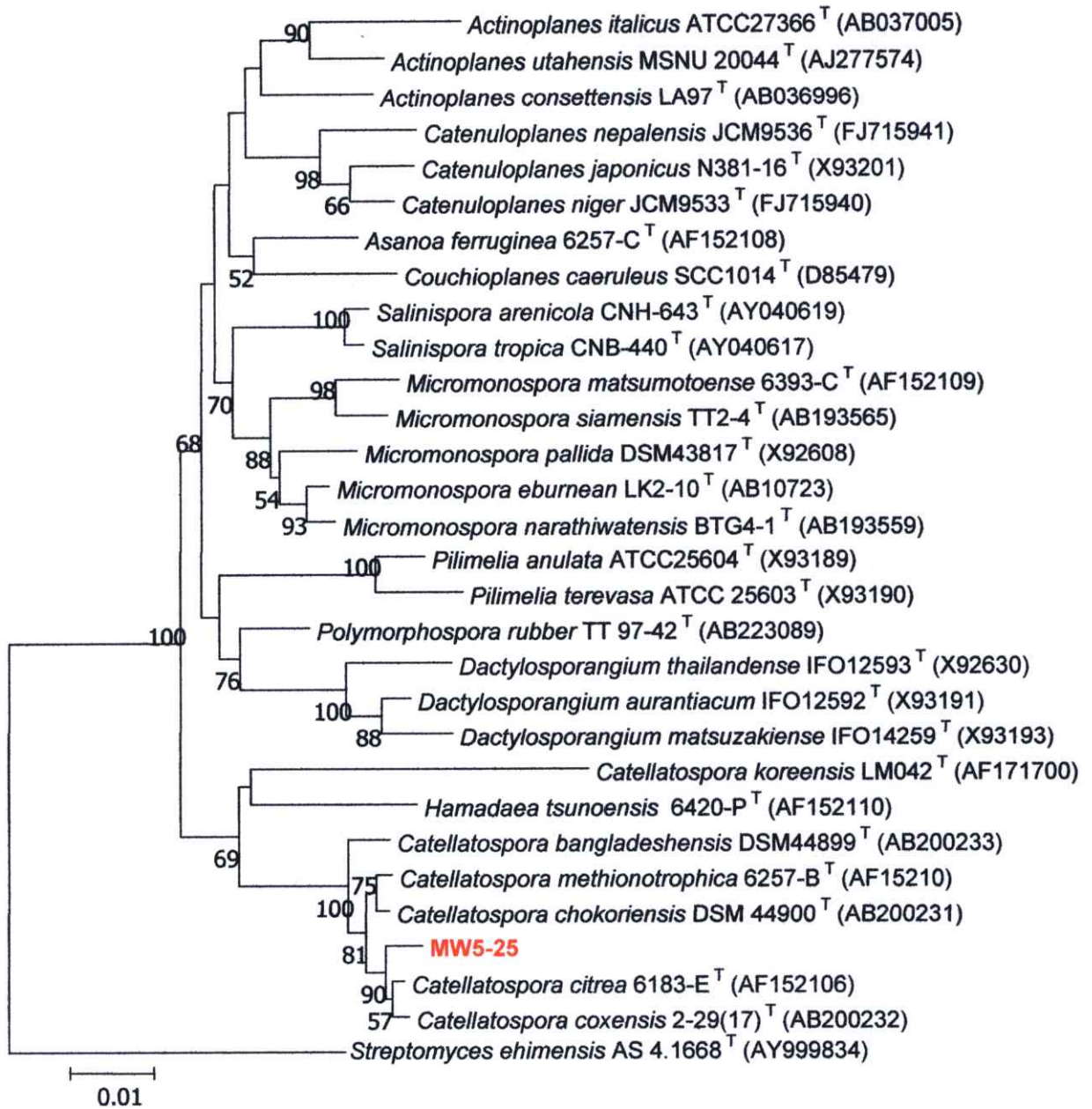
รูปที่ 4.22 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW4-35 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



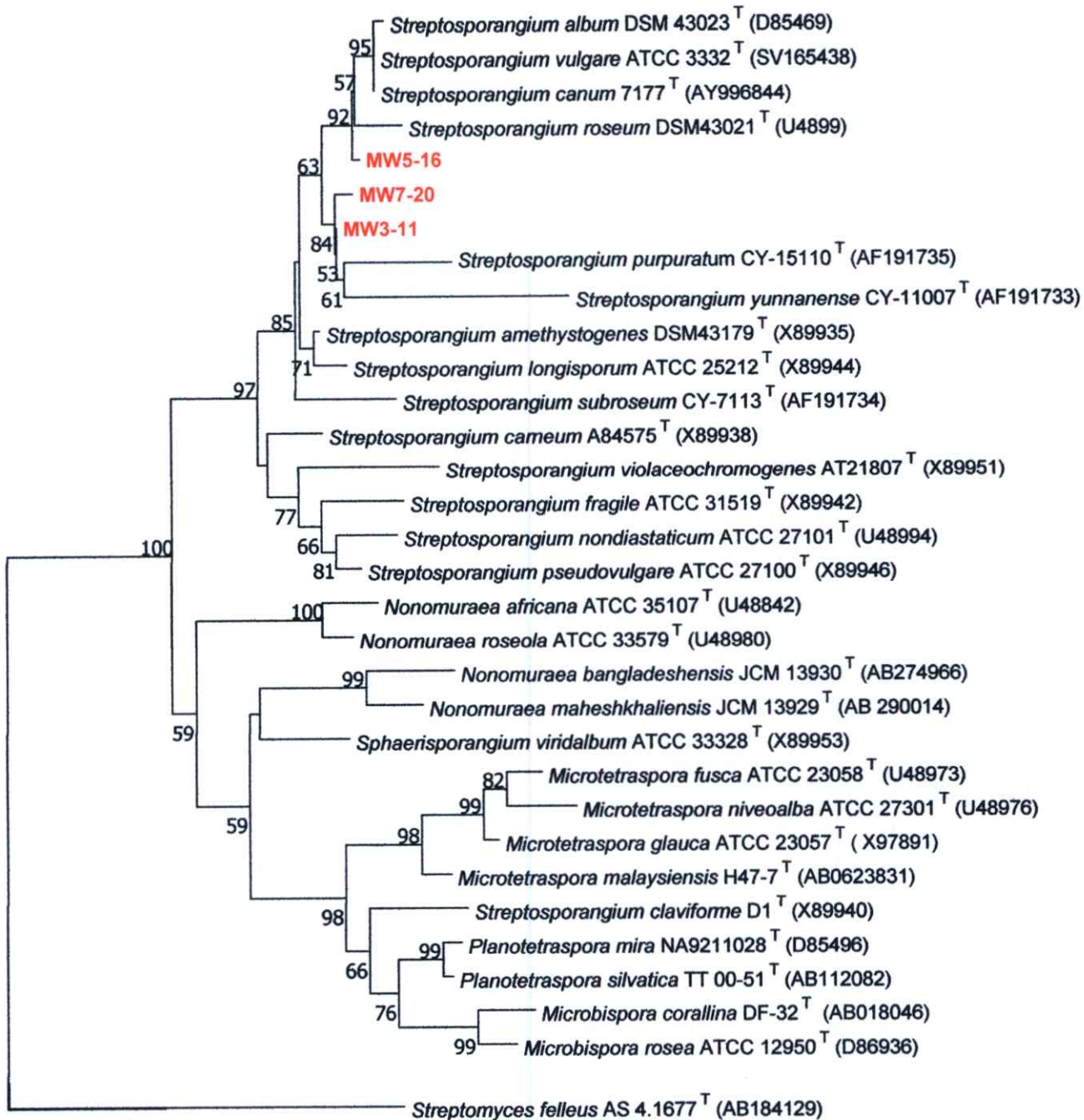
รูปที่ 4.23 แสดงตำแหน่งของเชื้อ ไอโซเลต MW2-5, MW10-13, MW10-12, MW12-5 และ MW13-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)



รูปที่ 4.24 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW2-25 และ MW4-36 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

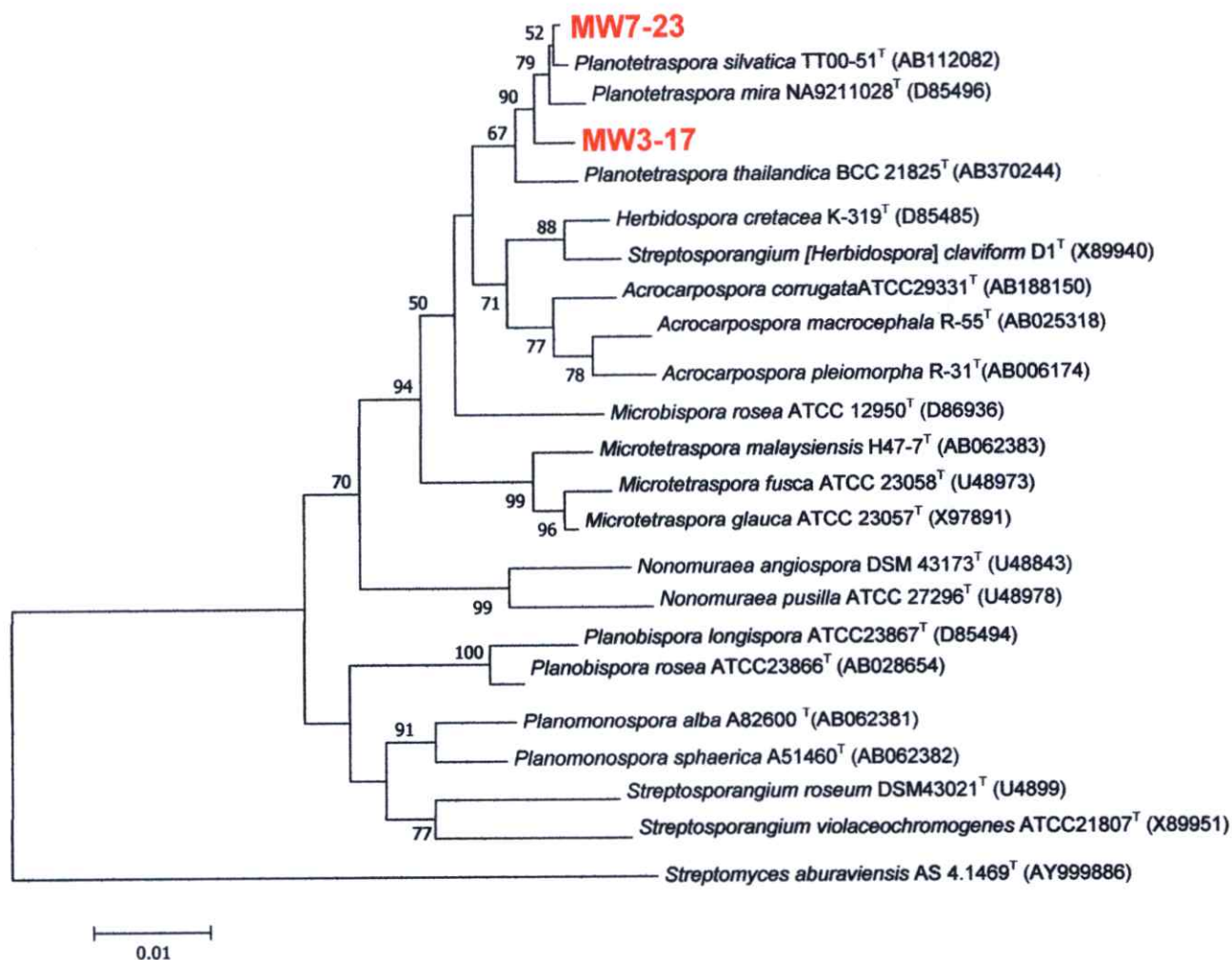


รูปที่ 4.25 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW5-25 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

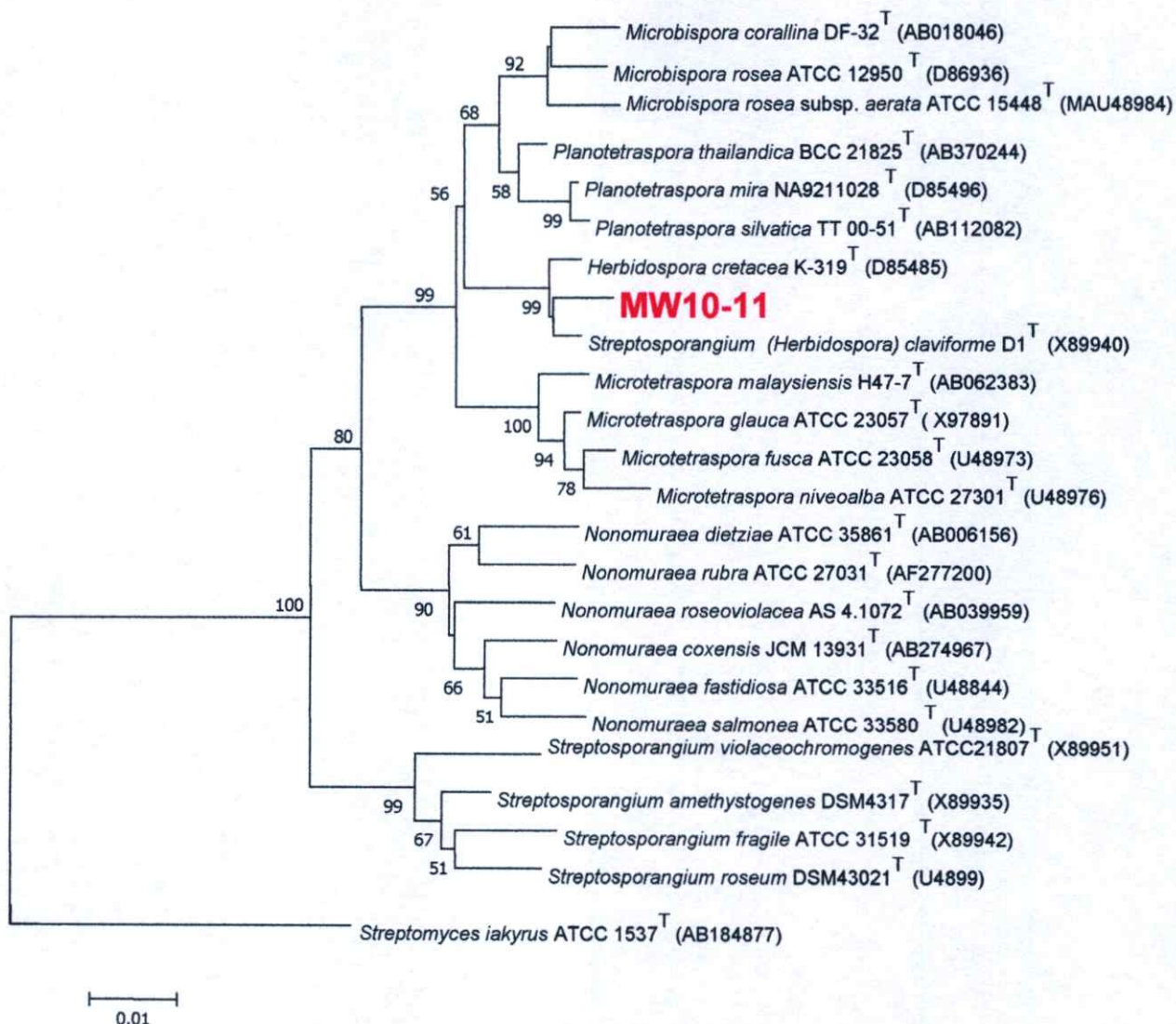


0.01

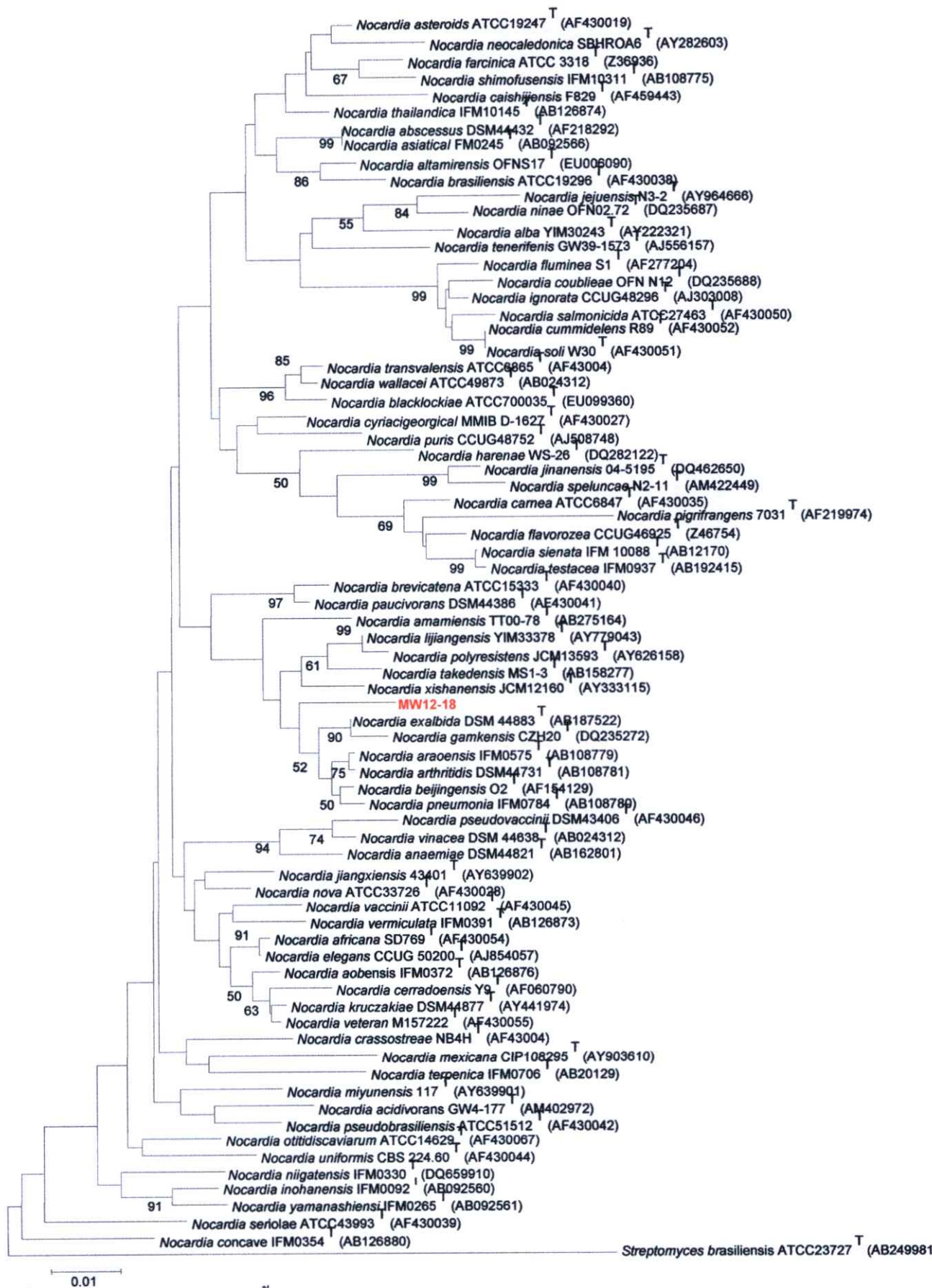
รูปที่ 4.26 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW3-11, MW5-16 และ MW7-20 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method)



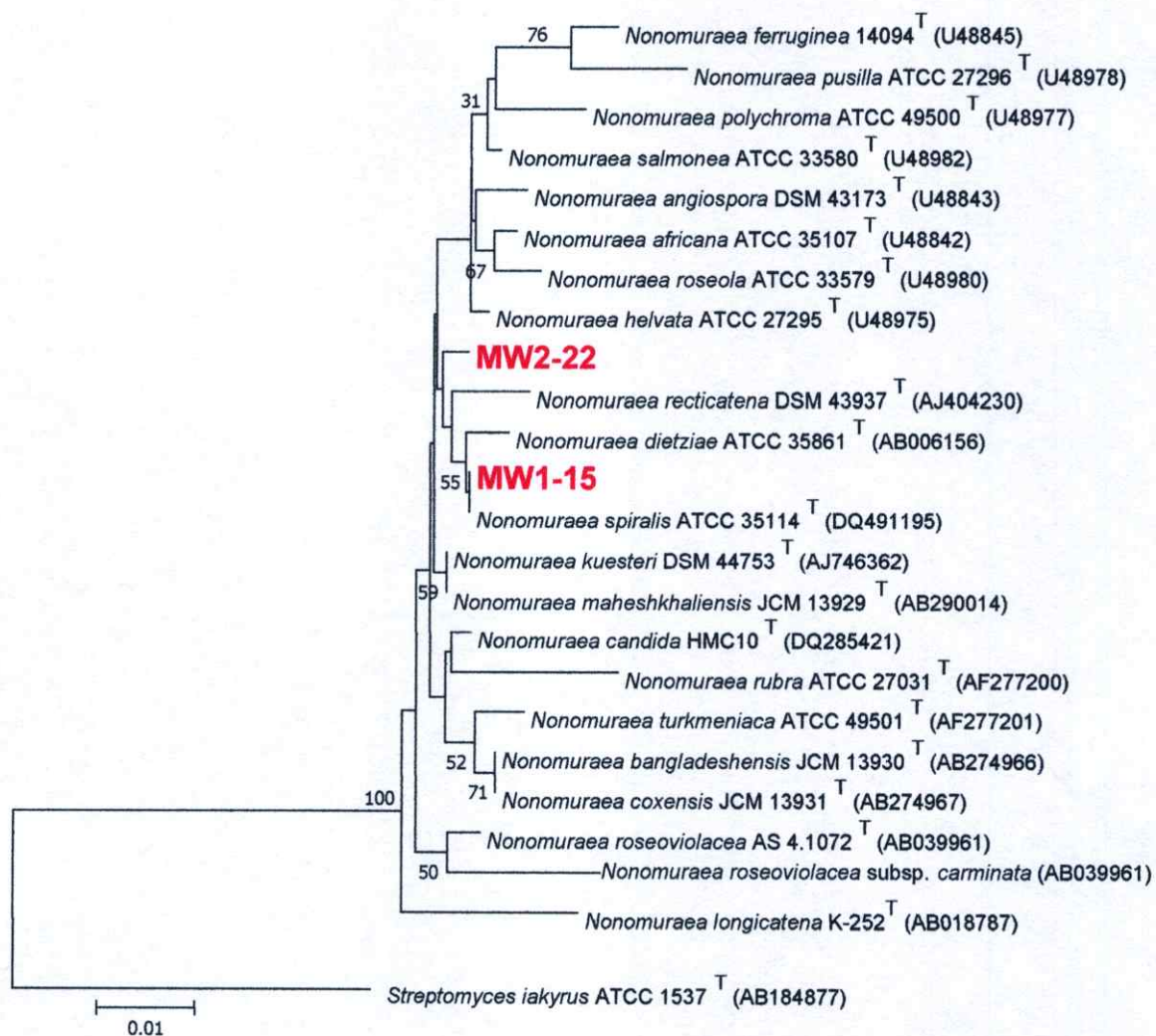
รูปที่ 4.27 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW3-17 และ MW7-23 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method)



รูปที่ 4.28 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW10-11 phylogenetic tree (Neighbor-Joining method)



รูปที่ 4.29 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW12-18 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method)



รูปที่ 4.30 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต MW2-22 และ MW1-15 บน phylogenetic tree (Neighbor-Joining method)

การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอสกีโนมัยซีททั้ง 19 กลุ่ม พบว่าเชื้อแอสกีโนมัยซีท ไอโซเลต MW2-25 (กลุ่มที่8) มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ของเชื้อในสกุล *Dactylosporangium* เนื่องจากมีลักษณะทางฟีโนไทป์ต่างไปจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ในสกุล *Dactylosporangium* รวมทั้งมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง 16S rDNA gene อยู่ในระดับต่ำ (99.3) จึงคัดเลือกเชื้อไอโซเลตนี้ไปศึกษาอนุกรมวิธานอย่างละเอียดเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด

จากการศึกษาเพิ่มเติมดังกล่าวพบว่าเชื้อไอโซเลต MW2-25 มีความแตกต่างจากเชื้อ *Dactylosporangium aurantiacum* NBRC12592<sup>T</sup> ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความใกล้เคียงที่สุดบน phylogenetic tree ในด้านความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนม ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 5) และสามารถใช้น้ำตาล lactose, L-arabinose, D-fructose D-melibiose และ D-ribose (ตารางที่4.6) นอกจากนี้ผลการศึกษาการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) ระหว่างเชื้อไอโซเลต MW2-25 และเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ในสกุล *Dactylosporangium* ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 9.6-31.7 (ตารางที่4.7) จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต MW2-25 เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Dactylosporangium*

#### การบรรยายลักษณะของเชื้อ *Dactylosporangium maewongense* (description of *Dactylosporangium maewongense*)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ขอบอุณหภูมิตั้งแต่ 10-30 องศาเซลเซียส สร้างถุงหุ้มสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายนิ้วมือบน ก้านชูสปอร์ที่สั้นต่อจากเส้นใยอาหาร พื้นผิวสปอร์มีลักษณะเรียบ สปอร์สามารถว่ายน้ำได้ สร้าง globose bodies บนอาหารตัดแปลงสูตร soil extract agar และ humic acid-vitamin agar ไม่พบเส้นใยอากาศ โคโลนีเป็นสีส้มอมเหลืองบนอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ย่อยสลายไนเตรตได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดคือ น้ำตาล cellobiose, D-mannitol, D-raffinose, glycerol และ salicin ได้ดี ใช้น้ำตาล D-galactose, D-ribose, D-xylose และ L-rhamnose ได้ น้อย แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose, L-arabinose, D-fructose และ D-melibiose ได้ สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม แป้ง และเจลาตินได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส ทนความเข้มข้นของเกลือได้สูงสุดที่ร้อยละ 3 ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดกลูตามิก (glutamic acid) ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) meso-DAP และ 3-OH-meso-DAP ชนิดเอซิล (acyl) ของผนังเซลล์เป็นไกลโคลิล (glycolyl) พบเมนาควิโนน (menaquinone) ชนิด MK-9(H<sub>8</sub>) เป็นองค์ประกอบหลัก ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (whole cell sugar) คือไซโลส (xylose) แรมโนส (rhamnose) ไรโบส (ribose) และอะราบินโนส (arabinose) มี diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, lysyl phosphatidylglycerol และ phosphatidylethanolamine แต่ไม่พบ phosphatidylcholine เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดในเซลล์ ชนิดของกรดไขมันเป็นชนิด 3b (type 3b) คือประกอบด้วย iso-C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub>, cis-9-C<sub>18:1</sub>, anteiso-C<sub>17:1</sub>, cis-9-C<sub>17:1</sub> และ 10-methyl-C<sub>17:0</sub>

(ตารางที่4.8) ไม่พบกรดไมคอิลิก (mycolic acids) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) เท่ากับร้อยละ73.2 สายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) คือ MW2-25<sup>T</sup> (=BCC 34832<sup>T</sup> =JCM 15933<sup>T</sup>) คัดแยกได้จากตัวอย่างดินอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย

ตารางที่ 4.6 ลักษณะความแตกต่างของเชื้อเอคโตไมซีทีทสายพันธุ์ MW2-25<sup>T</sup> และ MW4-36 กับเชื้อมาตรฐาน (type strain) ของสกุล *Dactylosporangium*

ลักษณะทางฟีโนไทป์	1	2	3	4	5	6	7	8
Formation of globose bodies on HV agar	ปานกลาง	-	สีมาก Deep yellowish Orange	สีมาก Deep Orange	-	-	Vivid Yellowish Pink	สีมาก Orange
สีโคโลนิบนอาหาร ISP 2	ไม่มี	Brilliant Orange Yellow	ไม่มี	ไม่มี	Vivid red	Orange	Pink	Orange
สีรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหาร ISP 2	+	-	+	-	+	-	-	-
การสลายเจลาติน	+	-	+	-	-	-	+	+
การสลายไนเตรต	+	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยโปรตีนในนม	+	-	-	-	+	-	-	-
การย่อยแป้ง	+	+	+	+	+	-	-	+
การเจริญที่ 42 °C	w	-	w	-	-	-	w	w
ความทนเกลือ (%)	3	4	3	1.5	3	1.5	2	3
ความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดที่ทนได้	5	6	6	6	6	6	6.5	6.5
การใช้แหล่งคาร์บอน								
D-fructose	-	w	+	+	+	w	+	w
D-galactose	w	+	+	+	+	-	w	w
D-mannitol	+	w	w	w	+	+	-	+
D-melibiose	-	w	+	-	w	w	w	w
D-raffinose	+	w	w	+	w	+	-	-
D-ribose	w	-	-	-	w	-	w	w
Glycerol	+	w	w	-	w	+	w	-
Lactose	-	w	+	w	w	-	w	w
L-arabinose	-	+	+	w	w	-	w	w
L-rhamnose	w	+	+	w	+	w	-	-

หมายเหตุ Strains: 1, MW2-25<sup>T</sup>; 2, MW4-36; 3, *D. aurantiacum* NBRC 12592<sup>T</sup>; 4, *D. thailandense* NBRC 12593<sup>T</sup>; 5, *D. vinaceum* NBRC 14181<sup>T</sup>; 6, *D. matsuzakense* NBRC 14259<sup>T</sup>;

7, *D. roseum* NBRC 14352<sup>T</sup>; 8, *D. fulvum* NBRC 14381<sup>T</sup> (+, Positive; -, Negative; W, weakly positive.)

ตารางที่ 4.7 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต MW2-25, MW4-36 และเชื้อสายพันธุ์  
มาตรฐาน (type strain) ของสกุล *Dactylosporangium*

สายพันธุ์	DNA-DNA binding (%) with labelled DN A from <sup>a</sup> :	
	MW2-25 <sup>T</sup>	MW4-36
MW2-25 <sup>T</sup>	100 ± 0.68	40.4 ± 0.11
MW4-36	40.4 ± 0.11	100 ± 0.05
<i>D. aurantiacum</i> NBRC 12592 <sup>T</sup>	31.7 ± 0.99	37.7 ± 0.07
<i>D. thailandense</i> NBRC 12593 <sup>T</sup>	9.6 ± 0.44	19.1 ± 0.02
<i>D. vinaceum</i> NBRC 14181 <sup>T</sup>	22.3 ± 1.38	28.5 ± 0.08
<i>D. matsuzakiense</i> NBRC 14259 <sup>T</sup>	23.6 ± 0.69	19.4 ± 0.02

ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MW2-25<sup>T</sup> และ  
MW4-36

ชนิดของกรดไขมัน	MW2-25 <sup>T</sup> (ร้อยละ)	MW4-36 (ร้อยละ)
<b>Saturated fatty acids</b>		
C <sub>16:0</sub>	2.2	4.0
C <sub>17:0</sub>	2.2	2.7
C <sub>18:0</sub>	2.3	4.1
10-methyl C <sub>17:0</sub>	0.8	-
<b>Unsaturated fatty acids</b>		
cis-9-C <sub>17:1</sub>	0.8	-
cis-9-C <sub>18:1</sub>	2.0	1.3
<b>Branched fatty acids</b>		
i-C <sub>14:0</sub>	7.9	2.7
i-C <sub>15:0</sub>	25.9	25.4
a-C <sub>15:0</sub>	15.4	16.6
i-C <sub>16:0</sub>	27.9	22.6
i-C <sub>17:0</sub>	2.3	4.2
a-C <sub>17:0</sub>	7.3	15.0
a-C <sub>17:1</sub>	1.1	-

### 4.3 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่สกัดแยกได้

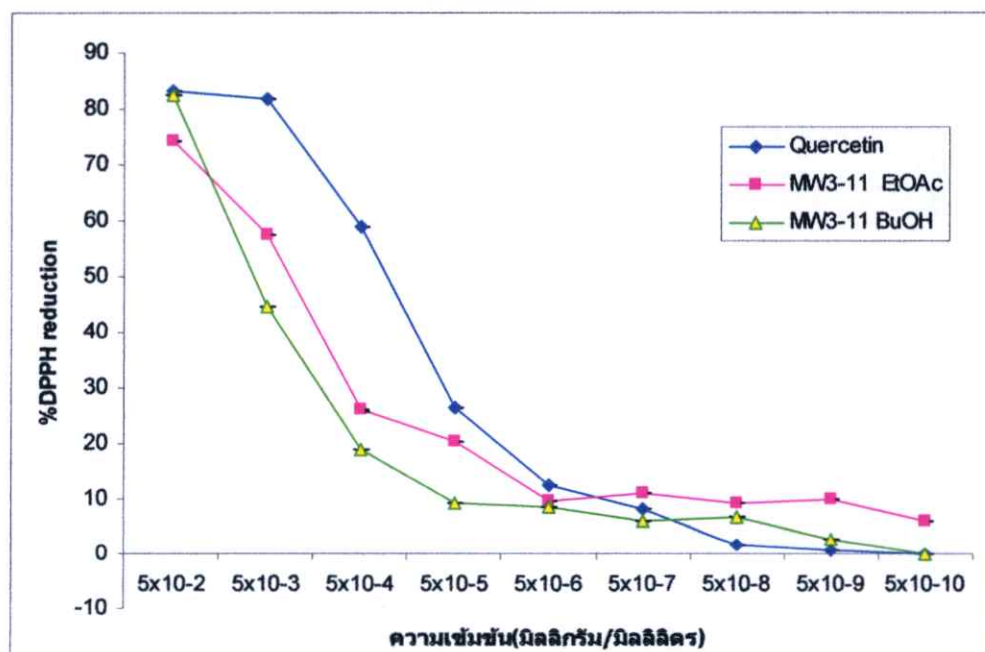
นำเชื้อแอสกีโนมัยซีทตัวแทนในแต่ละกลุ่มมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (ISP2) บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอล พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอลของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 11 (MW3-11) และเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 14 (MW3-17) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 11 (MW3-11) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Micrococcus luteus* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 8 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 7 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 14 (MW3-17) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Micrococcus luteus* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 8, 7 และ 11 มิลลิเมตร ตามลำดับ

### 4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging method

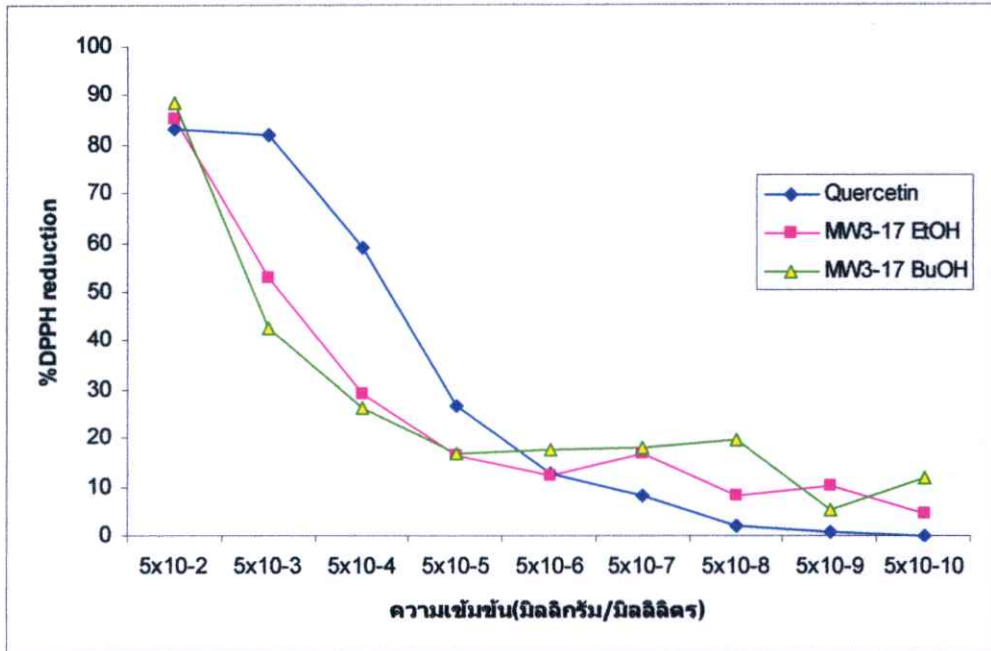
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเชื้อตัวแทนกลุ่ม 11 และ 14 คือรหัส MW3-11 และ MW3-17 ตามลำดับเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทิน เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอลของเชื้อรหัส MW3-11 แสดงค่าร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้น  $5 \times 10^{-2}$  เท่ากับร้อยละ 74.4 และ 82.6 ตามลำดับและมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.70 \pm 0.07 \times 10^{-3}$  และ  $1.26 \pm 0.05 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (รูปที่ 4.31) สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอลของเชื้อรหัส MW3-17 แสดงค่าร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้น  $5 \times 10^{-2}$  เท่ากับร้อยละ 85.1 และ 88.7 ตามลำดับและมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $2.08 \pm 0.2 \times 10^{-3}$  และ  $1.87 \pm 0.1 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (รูปที่ 4.32) ซึ่งน้อยกว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทินที่แสดงการดักจับอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้น  $5 \times 10^{-2}$  เท่ากับร้อยละ 83.3 และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.34 \pm 0.3 \times 10^{-4}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรและค่าร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอล

ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรและค่า %DPPH reduction ของสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด									
	MW3-11 เอทิลอะซิเตต		MW3-11 บิวทานอล		MW3-17 เอทิลอะซิเตต		MW3-17 บิวทานอล		สารละลายมาตรฐาน เคอร์เซทิน	
	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%
$5 \times 10^{-2}$	0.232±0.001	74.4	0.157±0.001	82.6	0.135±0.001	85.1	0.102±0.001	88.7	0.151±0.006	83.3
$5 \times 10^{-3}$	0.386±0.002	57.4	0.503±0.003	44.5	0.429±0.001	52.7	0.52±0.001	42.6	0.164±0.011	81.9
$5 \times 10^{-4}$	0.672±0.031	25.9	0.736±0.001	18.8	0.641±0.001	29.3	0.667±0.001	26.4	0.371±0.004	59
$5 \times 10^{-5}$	0.723±0.005	20.2	0.822±0.009	9.3	0.76±0.001	16.2	0.752±0.005	17	0.665±0.001	26.6
$5 \times 10^{-6}$	0.82±0.001	9.5	0.83±0.004	8.4	0.796±0.013	12.2	0.745±0.003	17.8	0.792±0.026	12.6
$5 \times 10^{-7}$	0.805±0.021	11.2	0.851±0.005	6.1	0.755±0.049	16.7	0.744±0.004	17.9	0.832±0.005	8.2
$5 \times 10^{-8}$	0.822±0.003	9.3	0.846±0.002	6.7	0.831±0.050	8.3	0.728±0.006	19.7	0.889±0.001	1.9
$5 \times 10^{-9}$	0.816±0.002	10	0.879±0.032	3	0.813±0.004	10.3	0.859±0.004	5.2	0.915±0.011	0.8
$5 \times 10^{-10}$	0.851±0.003	6.1	0.907±0.021	0	0.867±0.007	4.4	0.8±0.007	11.7	0.945±0.009	0



รูปที่ 4.31 ร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอลของเชื้อรหัส MW3-11 เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทินในตัวทำละลายผสมของเมทานอลและ DMSO (อัตราส่วน 1:1)



รูปที่ 4.32 ร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตและบิวทานอลของเชื้อรหัสมะเขือเทศ MW3-17 เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์เซทินในตัวทำละลายผสมของเมทานอล และ DMSO (อัตราส่วน 1:1)

#### 4.5 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

สารสกัดหยาบของเชื้อตัวแทนกลุ่มกลุ่ม 11 และ 14 คือ รหัสมะเขือเทศ MW3-11 และ MW3-17 ตามลำดับที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB (sulforhodamine B colorimetric method) พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อตัวแทนกลุ่มทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ african green monkey kidney fibroblast ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกแอสคิโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ พบว่าตัวอย่างดินที่เป็นซากอินทรีย์สารพบเชื้อแอสคิโนมัยซีทหายากมากที่สุดสอดคล้องกับ Miyadoh (1997) ที่รายงานว่าตัวอย่างดินที่มีปริมาณฮิวมัสในดินมากมักพบประชากรของแอสคิโนมัยซีทได้มากเช่นกัน เมื่อนำตัวอย่างดินมาเตรียมเพื่อแยกเชื้อด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส การต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส การใช้สารละลายฟีนอล โดยแยกบนอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตรพบว่าวิธีเตรียมตัวอย่างโดยการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส บนอาหารสูตร humic acid vitamins agar พบประชากรของเชื้อแอสคิโนมัยซีทหายากได้มากที่สุด เช่นเดียวกับชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา และคณะ (2546) ที่ทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารสูตร humic acid vitamins agar สามารถจัดจำแนกเชื้อแอสคิโนมัยซีทหายากได้ 10 สกุล เช่นเดียวกับกับ Ara และคณะ (2007) ที่ค้นพบ *Nonomuraea bangladeshensis* และ *Nonomuraea coxensis* บนอาหาร humic acid vitamin agar ที่เติมไซโคลเฮกซ์ไมด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นิสเททิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดนาลิคซิก 20 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมถึงสอดคล้องกับ Srivibool และ Sukchotiratana (2006) ที่สามารถคัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทได้เป็นจำนวนมากจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีข้างต้น

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทตัวแทนในแต่ละกลุ่มพบว่าสารสกัดหยาบส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในระดับต่ำสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Berdey (2005) ที่รายงานไว้ว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีทหายากมักสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ต่ำกว่าเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งจัดเป็นแอสคิโนมัยซีททั่วไป และ Srivibool และ Sukchotiratana (2006) ที่คัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทจากตัวอย่างดินบริเวณชายฝั่งของ เกาะช้าง เกาะหวาย เกาะเลาในจังหวัดตราด และเกาะปาย จังหวัดชลบุรี ได้ 495 ไอโซเลตซึ่งมีเพียง 48 ไอโซเลต ที่มีกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 885, *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* TISTR 884, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ *Escherichia coli* TISTR 887 (ATCC 25922) ได้

ในการวิจัยครั้งนี้ถือเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอสคิโนมัยซีทหายากในประเทศไทย ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างดีแต่ยังแสดงฤทธิ์ได้น้อยกว่าสารมาตรฐานคอร์เซทินตลอดจนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ african green monkey kidney fibroblast ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้ถือเป็นงานวิจัยชิ้นบุกเบิกเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีจากแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์แหล่งใหม่เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลต พบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทที่แสดงชนิดของไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมติกในผนังเซลล์แบบ LL-DAP (ที่ไม่ใช่เชื้อสกุล *Streptomyces*) 3 ไอโซเลต และพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงชนิดไอโซเมอร์ของกรดโคอะมิโนพิเมติกในผนังเซลล์แบบ meso-DAP (เชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก, rare actinomycetes) 72 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากออกเป็น 19 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์จากการแตกหักของเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นเส้นยาว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Pseudonocardia*

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์จากการแตกหักของเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะเป็นแท่งหรือกลมต่อกัน เส้นใยอาหารแตกเป็นกิ่งก้าน มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Kribbella*

กลุ่มที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร โดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 8 และ 9 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ พบสปอร์แรงเจียรูปท่อนลักษณะคล้ายนิ้วมือรวมกันอยู่เป็นช่อ ภายในมีสปอร์รูปร่างรี สามารถเคลื่อนที่ได้ และพบ globose body จำนวนมาก มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Dactylosporangium*

กลุ่มที่ 10 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์สายสั้นชูขึ้นจากเส้นใยอาหาร ไม่พบเส้นใยอากาศ มีสายของสปอร์ต่อกัน 3-4 สายต่อ 1 กลุ่มสปอร์ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Catellatospora*

กลุ่มที่ 11, 12 และ 13 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสปอร์อยู่ในถุงสปอร์แรงเจียร มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptosporangium*

กลุ่มที่ 14 และ 15 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสปอร์แรงเจียรที่มีลักษณะเป็นท่อนยาวเห็นรอยคอดของสปอร์แบ่งเป็น 4 ส่วน ภายในบรรจุด้วยสปอร์รูปกลมรีต่อกัน มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Planotetraspora*

กลุ่มที่ 16 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์เป็นกลุ่ม มีลักษณะเป็นสายตรงสั้นอยู่บนก้านชูสปอร์ที่ต่อจากเส้นใยอาหารและไม่มีเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Herbidospora*

กลุ่มที่ 17 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สามารถสร้างสปอร์สายสั้นๆ ในแต่ละสายมีสปอร์อยู่ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ ก้านชูสปอร์แตกกิ่งก้านและเส้นใยหักเป็นท่อนๆ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Nocardia*

กลุ่มที่ 18 และ 19 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศไม่แตกหักเป็นท่อนต่อกับเส้นใยอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียวต่อกันเป็นสายแต่ละสายมีสปอร์ประมาณ 8 ถึง 12 สปอร์บนก้านชูสั้นต่อกับเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Nonomuraea*

จากเชื้อแอสโคไมซีตข้างต้นพบว่า เชื้อแอสโคไมซีต ไอโซเลต MW2-25 (กลุ่มที่ 8) แสดงลักษณะทางเคโมไทป์เหมือนกับเชื้อสกุล *Dactylosporangium* แต่แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) สกุล *Dactylosporangium* ทั้งหมดในระดับต่ำ และค่าร้อยละการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 9.6-31.7 รวมถึงแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ทั้งหมดในสกุล *Dactylosporangium* จากข้อมูลดังกล่าวสามารถยืนยันว่าเชื้อไอโซเลตนี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Dactylosporangium* โดยให้ชื่อว่า *Dactylosporangium maewongense* MW2-25<sup>T</sup> (NBRC12592<sup>T</sup>) ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ในปี 2009 ชื่อเรื่อง *Dactylosporangium maewongense* sp. nov., isolated from a Thai soil.

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอสโคไมซีตตัวแทนในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเอ็น-บิวทานอลของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 11 และ 14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอลของเชื้อไอโซเลต MW 3-11 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $1.26 \pm 0.05 \times 10^{-3}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเคอร์เซทินที่มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $3.34 \pm 0.3 \times 10^{-4}$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB (sulforhodamine B colorimetric method) พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อตัวแทนทุกกลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ african green monkey kidney fibroblast

จากงานวิจัยนี้สามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่พบจากดินในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทยได้หลายสกุล ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- เกรียงไกร จำเริญมา, วัลลภญา ตันติบุษ และ เตือนจิต สัตยาวิรุทธ์. 2539. “ประสิทธิภาพของ EM เพื่อป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบ”. วารสารเกษตรศาสตร์. 30 : 92-96.
- กรรณิการ์ ดวงมาลัย. 2552. คัดจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ชีวระ คุมโรครอบคในนาข้าว. [Online]. Available : [www.nanagarden.com/NanaNews2.aspx?RelaxID=10399](http://www.nanagarden.com/NanaNews2.aspx?RelaxID=10399)
- โครงการจอมป่า. 2548. ข้อมูลพื้นฐานอุทยานแห่งชาติแม่วงก์. มุลนิธิสืบนาคะเสถียร.[Online]. Available : [http://www.seub.or.th/JoMPA/pa/pa\\_008.html](http://www.seub.or.th/JoMPA/pa/pa_008.html)
- โครงการจัดการระบบฐานข้อมูลทรัพยากรในเขตอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 2548. อุทยานแห่งชาติแม่วงก์. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.[Online]. Available : <http://www.dnp.go.th/NPRD/project/maevong.php>
- ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จริญญา เจตนะจิตร, พงษ์ สุนทรนันท์ และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. “เชื้อแอคตินอมัยสียจากคินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง”. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ ครั้งที่ 41. กรุงเทพฯ : สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. “แอคตินอมัยสียที่หายากในคินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราชและสถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวจากกสถิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- ไพรัตน์ สงทอง. 2551. เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย gel Electrophoresis. [Online]. Available : [www.satriwit.ac.th/.../index.php?](http://www.satriwit.ac.th/.../index.php?)
- วราภรณ์ บัลลังก์นาค, สงกรานต์ เชื้อครุฑ และ กัลยา ปรีชานุกูล. 2550. “การแยกและการคัดเลือกเชื้อแอคตินอมัยสียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียคือยา”. ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- อานัฐ ดันโซ. 2551. บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในการเกษตร. [Online]. Available : [http://www.be2hand.com/scripts/shop.php?do=article\\_detail&news\\_id=2465&user=kasedins ee](http://www.be2hand.com/scripts/shop.php?do=article_detail&news_id=2465&user=kasedins ee)
- อุไรวรรณ วิจารณ์กุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

- Ara, I., Kudo, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y. and Omura, S. 2007. "*Nonomuraea bangladeshensis* sp.nov. and *Nonomuraea coxensis* sp. Nov". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57 : 1504–1509.
- Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. **The society for Actinomycetes**, Japan.
- Asolkar, R.N., Schroder, D., Heckmann, R., LangS, W.D. and Laatsch, H. 2004. "Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hell". **Journal of Antibiotics**. 57 : 17-23.
- Berdy, J. 2005. "Bioactive microbial metabolites". **Journal of Antibiotics**. 58 : 1-26.
- Boudiella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. 2006. "Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil". **Microbiology research**. 161 : 288-298.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A.T., Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A. and Bolek, W. 2005. "Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica". **Journal of Antibiotics**. 58 : 346-349.
- Charan, R.D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X. and Carter, G.T. 2004. "Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp". **Journal of Natural Products**. 67 : 1431-1433.
- Coyne, M.S. 1999. **Soil microbiology : an exploratory approach delmar**. An International Thomson Publishing company, USA. 102-106.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2003. "Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*". **Angewandte Chemie International Edition in English**. 42 : 355-357.
- Gathogo, W.N.E., Waugh, C.W.A., Peric-Concha, N., Redpath B.M. and Long, F.P. 2004. "Rapid detection of "rare" actinomycetes in environmental samples". **Biotechnology Letters**. 26 : 897-900.
- Goodfellow, M. and Simpson, K.E. 1987. "Ecology of streptomycetes". **Frontiers in Applied Microbiology**. 2 : 97-125.
- Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, J.Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K. and Shibai, H. 2005. "Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium". **Journal of**

**bioscience and biotechnology.** 5 : 485-492.

Isaac, S. and Jennings, D. 1995. **Microbial Culture.** Bios Scientific Publishers Limited. UK. 133 pp.

Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M. and Shizuri, Y. 2005. "Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251". **Journal of Antibiotics.** 58 : 289-292.

Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. "Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics". **Methods in microbiology.** 19 : 161-207.

Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. and Gerber, N.N. 1971. "Chemical composition as criterion in the classification of actinomycetes". **Advance In Applied Microbiological.** 14 : 47-72.

Lechevalier, M. P., Stern, A. E. and Lechevalier, H. A. 1981. "Phospholipids in the taxonomy of Actinomycetes". **Journal of Zentbl Bakteriol Hyg Abt 1 Suppl.** 11 : 111-116.

Liu, J., Barry, E.C., Besra, S.G., and Nikaido, H. 1996. "Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall". **The Journal of Biological Chemistry.** 271 : 29545-29551.

Lorain, V. 1980. **Antibiotics in laboratory medicine.** Baltimore. The Williams & Wilkins Co.

Maskey, R.P., Li, F.C., Qin, S., Fiebig, H.H. and Laatsch, H. 2003. "Chandrananimycins A~C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions". **Journal of Antibiotics.** 56:622-629.

Matsumoto, A. Takahashi, Y., Shinose, M., Seino, A., Iwai, Y. and Omura, S. 2003. "*Longispora albida* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Micromonosporaceae*". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 53 : 1553-1559.

Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. "An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids". **Journal of Microbiol Methods.** 2 : 233-241.

Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. **The Society for Actinomycetes Japan.** Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.

Philip, G.W. 2008. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Rends in Biotechnology.** 0167-7799.

Pimentel-Elardo S. M., Tobias A. M. Gulder, Ute Hentschel and Gerhard Bringmann. 2008. "Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*,

- the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*". **Tetrahedron Letters**. 49 : 6889–6892.
- Rheims, H., Felske, A., Seufert, S. and Stackebrandt, E. 1999. "Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments". **Journal of Microbiological Methods**. 36 : 65-75.
- Riedlinger J, Reicke A, Zahner H, Krismer B Bull AT, Maldonado LA, Ward AC, Good fellow M, Bister B, Bischoff Detal. 2004. "Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032". **Journal of Antibiotics**. 57 : 271-279.
- Schlegel, G. 1997. The system of prokaryotes. **General microbiology 6<sup>th</sup> ed.** 92-419 pp.
- Shirling E.B., and Gottlieb, D. 1996. "Methods for characterization of *Streptomyces* species". **International Journal of System Bacteriol.** 16 : 313-340.
- 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.
- Skehan, P., Ritsa, S., Dominic, S., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. 1990. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". **Journal of the National Cancer Institute**. 82 : 1107-1112.
- Soria-Mercado, I.E., Prieto-Davo, A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. **Journal of Natural Products**. 68 : 904-910.
- Srivibool, R., Kurakami, K., Sukchotiratana, M., and Tokuyama, S., 2004. "Coastal Soil Actinomycetes : Thermotolerant Strains Producing *N*-Acylamino Acid Racemase". **Science Asia**. 30 : 123-126.
- Srivibool, R. and Sukchotiratana, M. 2006. "Bioprospective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers". **Songklanakarin Journal Science Technology**. 28(3) : 493-499.
- Srivibool, R. and Sukchotiratana, M. 2006. "Pigmented Actinomycetes from coastal areas and their bioactive secondary metabolites". **Journal of Science, Technology and Humanities**. 4 : 11-18.

- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. 1997. "Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 47 : 479–491.
- Suzuki, S. 2001. "Establishment and use of gellan gum media for selective isolation and distribution survey of Specific rare actinomycetes". **Actinomycetol**. 15 : 55-60.
- Takahashi, Y. and Omura, S. 2003. "Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds". **Journal of Antibiotics**. 35 : 123-141.
- Vobis, G. 1997. "Morphology of Actinomycetes. Atlas of Actinomycetes". **The Society for Actinomycetes Japan**. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Willington, E.M., Sneath, P.H., Sacki, M.J., 1983. "Numerical classification of *Streptomyces* and related genera". **Journal of General Microbiol**. 49 : 141–154.
- Williams, S.T., Shape, M.E. and Holt, J.G. 1989. **Bergey's Manual and Systematic Bacteriology. Volumn 4**. Baltimore : The Williams & Wilkins Company.
- Yamasaki, K. 1994. "DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) redical scavenging assay". **Chemical Pharmacology**. 42 : 1663-1665.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. 2005. "*Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. Nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the *α-Proteobacteria*". **Journal of Applied Microbiological**. 51 : 301-311.
- Yukphan, P. 2006. "Systemmatic study of acetic acid bacteria isolated in Thailand". Ph.D. of The United Graduated School of Agriculture Science, Gifu University. Japan.
- Zhi, X.Y., Li, W.J. and Stackebrandt, E. 2009. "An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 59 : 589–608.

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ**

AV-Medium with basic antibiotics

Glucose	1.0 กรัม
Glycerol	1.0 กรัม
L- asparagine	0.3 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 กรัม
NaCl	0.3 กรัม
Trace elements mix 1	0.1 มิลลิลิตร
Agar	18.0 กรัม
Water	1 ลิตร
pH	6.4
Vitamins mix 1	1 มิลลิลิตร
Nalidixic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	0.025 กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% เอทานอล)	0.05 กรัม
Terbinafin (ละลายในเมทานอล)	0.01 กรัม

Humic acid-salts vitamin agar , modified, with basic antibiotics

Humic acid (ละลายใน 0.2N NaOH 10 มิลลิลิตร)	1 กรัม
Yeast extract	0.05 กรัม
Casamino acid Na	0.02 กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 กรัม
KCl	1.7 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.01 กรัม
Trace elements mix 1	0.2 มิลลิลิตร
Agar	18 กรัม
Water	1 ลิตร

pH	7.0
Vitamins mix. A1	1 มิลลิลิตร
Nalidixic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	0.025 กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% เอทานอล)	0.05 กรัม
Terbinafin (ละลายใน เมทานอล)	0.01 กรัม

Soil extract medium, modified

CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5 กรัม
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.25 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 กรัม
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.03 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 กรัม
Trace elements mix 1	0.3 มิลลิลิตร
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02 กรัม
Yeast extract	0.1 กรัม
Casamino acids	0.1 กรัม
Glucose	0.2 กรัม
Soil extract	100 มิลลิลิตร
Agar	18 กรัม
Water	1 ลิตร

Soil extract medium , modified with basic antibiotics

CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5 กรัม
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.25 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 กรัม
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.03 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 กรัม
Trace elements mix 1	0.3 มิลลิลิตร
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02 กรัม
Yeast extract	0.1 กรัม

Casamino acids	0.1 กรัม
Glucose	0.2 กรัม
Soil extract	100 มิลลิลิตร
Agar	18 กรัม
Water	1 ลิตร
Vitamins mix 1	1 มิลลิลิตร
Nalidixic acid (ละลายใน 0.2 N NaOH)	0.025 กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% เอทานอล)	0.05 กรัม
Terbinafin (ละลายใน เมทานอล)	0.01 กรัม

#### Soil extract

Humic soil	1 กิโลกรัม
Water	1 ลิตร

#### Yeast extract – malt extract agar , YMA , ISP2

Yeast extract	0.4 กรัม
Malt extract	1 กรัม
Glucose	0.4 กรัม
Agar	1.5-1.8 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.3

#### Oatmeal agar , OM , ISP3

Oatmeal	2.0 กรัม
Agar	1.8 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

#### Inorganic salt – starch agar , IS , ISP4

Soluble starch	1.0 กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 กรัม
NaCl	0.1 กรัม

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2 กรัม
$\text{CaCO}_3$	0.2 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.0-7.4

Glycerol – asparagine agar , Gly.A , ISP5

Glycerol	1.0 กรัม
L- asparagine	0.1 กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

Tyrosine agar , TA , ISP7

Glycerol	1.5 กรัม
L-Tyrosine	0.05 กรัม
L- Asparagine	0.1 กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 กรัม
NaCl	0.05 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 กรัม
Trace salt solution (A)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	2.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.2-7.4

## Carbon utilization medium , ISP9

Carbohydrate	1.0 กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.264 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.565 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :anhydrous	0.238 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 กรัม
Pridham and Gottlieb trace salt (B)	0.1 มิลลิลิตร
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	6.8-7.0
Casamino acid 0.05%	

## Nutrient agar , NA

Beef extract	1.0 กรัม
Peptone	1.0 กรัม
NaCl	0.15 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

## Glucose asparagines agar

Glucose	1.0 กรัม
Asparagine	0.05 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	6.8-7.0

## Czapek's sucrose agar

Sucrose	3.0 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.05 กรัม
KCl	0.05 กรัม
FeSO	0.001 กรัม

Agar	1.7 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.0-7.2

#### Peptone KNO<sub>3</sub> broth

Peptone	1.0 กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.1 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.0

#### Boullion gelatin broth

Peptone	1.0 กรัม
Meat extract	0.5 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
Gelatin	15.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.0-7.2

#### Peptenization and Coagulation test medium

Skim milk	10.0 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

#### Mueller-Hinton agar

Beef infusion from	30 กรัม
Casamino acid	1.74 กรัม
Starch	0.15 กรัม
Agar	1.7 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

## Sabourand's dextrose agar

Neopeptone	1.0 กรัม
Dextrose	4.0 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	5.6-5.8

## Production medium

Yeast extract	0.4 กรัม
Glucose	0.4 กรัม
Malt extract	1.0 กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.1 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.3

## Basal inorganic nitrogen medium

Carbohydrate	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 กรัม
KCl	0.02 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 กรัม
0.04% Bromocresol purple	1.5 มิลลิลิตร
Agar	1.5 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร
pH	7.0

## Vitamin Mix A1

p-aminobenzoic acid	0.05 กรัม
Calcium pantothenate	0.05 กรัม
Inositol	0.05 กรัม
Niacin	0.05 กรัม
Pyrioxin HCl	0.05 กรัม
Riboflavin	0.05 กรัม

Thiamine HCl	0.05 กรัม
Biotin	0.25 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

## Tract elements mix1

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 กรัม
$\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 กรัม
KI	0.05 กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2 กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 กรัม
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 95-97%p.a.	1 มิลลิลิตร
Water	1 ลิตร

## Trace salt solution (A)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
Water	100 มิลลิลิตร

## Pridham and Gottlieb trace salt (B)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11 กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79 กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 กรัม

## ภาคผนวก ข

### สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent)

#### 1. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อ

##### 1.1 สารละลายเบสิกลอริลซัลเฟต (basic lauryl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01

Na-Lauryl-sulfate	0.1	มิลลิกรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.75	มิลลิกรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3.5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH = 6.8-7.0

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.8 ถึง 7.0 นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

##### 1.2 สารละลายฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5

ฟีนอล	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	985	มิลลิลิตร

ตวงฟีนอลใส่ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.8 ถึง 7.0 นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

#### 2. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรด

##### ไดอะมิโนพิเมดิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid , DAP)

##### 2.1 สารละลายนินไฮดริน (ninhydrin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

นินไฮดริน	0.5	กรัม
อะซีโตน (acetone)	100	มิลลิลิตร

#### 3. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์

##### (whole-cell sugar)

##### 3.1 สารละลายอิมตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ )

ค่อยๆ ใส่แบเรียมไฮดรอกไซด์ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งแบเรียมไฮดรอกไซด์ไม่ละลายน้ำ

### 3.2 สารละลายแอนนิลีน พทาเลท (aniline phtalate)

กรดพทาลิก (phtalic acid)	3.25	กรัม
บิวทานอลที่อิมตัวด้วยน้ำ	100	มิลลิลิตร
แอนนิลีน (aniline)	2	มิลลิลิตร

## 4. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด

### 4.1 Dittmer และ Lester

สารละลาย A ชั่ง Molybdcic anhydride ( $\text{MoO}_3$ ) 4.011 กรัม ละลายใน กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 25 นอมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยความร้อน

สารละลาย B ชั่ง Molybdenum powder 0.178 กรัม ละลายใน สารละลาย A และคัมเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น บรรจุในขวดทึบแสง

ผสมสารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ฉีดพ่น

### 4.2 Ninhydrin

สารละลาย ninhydrin ร้อยละ 0.4 ในบิวทานอลที่อิมตัวด้วยน้ำ

### 4.3 Anisaldehyde

เอทานอล	90	มิลลิลิตร
กรดซัลฟูริก	5	มิลลิลิตร
<i>p</i> -anisaldehyde	5	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	1	มิลลิลิตร

### 4.4 Dragendorff

สารละลาย A ชั่ง basic bismuth nitrate ปริมาณ 1.7 กรัม ละลายในกรดอะซิติก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

สารละลาย B ชั่งโปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) ปริมาณ 40 กรัม ละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 10 มิลลิลิตร และเติมกรดอะซิติก ปริมาตร 80 มิลลิลิตรก่อนนำไปใช้ฉีดพ่น

## 5. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการวิเคราะห์เอซิดไทป์

### 5.1 DON Reagent

2,7-Dihydroxynaphthalene	10	มิลลิกรัม
กรดซัลฟูริก	50	มิลลิลิตร

เติมกรดซัลฟูริกใน 2,7-dihydroxynaphthalene (DON) รอจนกระทั่ง สารละลายเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็น ไม่มีสี (24 ชั่วโมง) เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง

## 6. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

### 6.1 TE buffer

Tris-HCl (pH 8.0), 10mM	10	มิลลิลิตร
EDTA (pH 8.0), 1mM	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	986	มิลลิลิตร

### 6.2 EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 ลิตร)

EDTA	372.24	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 นอร์มัล NaOH เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

### 6.3 Tris-Cl (pH 8.0), ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 ลิตร)

Tris-base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น		

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

### 6.4 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10

โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตปริมาณ 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

### 6.5 เอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

RNase A	20	มิลลิกรัม
NaCl (0.15 โมลาร์)	10	มิลลิลิตร

ซัง RNase A ปริมาณ 20 มิลลิกรัมใส่ใน NaCl ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที ทำการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

#### 6.6 Proteinase K ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Proteinase K 40 มิลลิกรัม

Tris-HCl (50 มิลลิโมลาร์) 10 มิลลิลิตร

ซัง Proteinase K ปริมาณ 40 มิลลิกรัมใส่ใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.5

### 7. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริดเคชัน

#### (DNA-DNA Hybridization)

#### 7.1 สารละลายโฟโตไบโอติน (photobiotin)

Photobiotin acetate 1 มิลลิกรัม

น้ำ nanopure 1 มิลลิลิตร

Tris-HCl 0.1 โมลาร์

EDTA (pH 9.0) 1 มิลลิโมลาร์

#### 7.2 สารละลาย 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0)

Tris-Base 12.1 กรัม

น้ำกลั่น

pH = 9.0

ซัง Tris-Base ปริมาณ 12.1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างที่ 9.0 ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

#### 7.3 สารละลายดีเอ็นเอไฮบริดเคชัน (hybridization solution) (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

20XSSC 1.0 มิลลิลิตร

100Xdenhardt Solution 0.5 มิลลิลิตร

Denatured salmon DNA 0.01 กรัม

TE buffer 1.0 มิลลิลิตร

Formamide 5.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	2.9	มิลลิลิตร
Dextran sulfate (50% solution)	0.5	มิลลิลิตร

ชั่ง denatured salmon DNA ปริมาณ 0.01 กรัม ใส่ใน TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว การทำผสมด้วยเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) นาน 3 นาที ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร เติม 20XSSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 100Xdenhardt Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วย Dextran sulfate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ formamide ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

#### 7.4 สารละลาย denhardt ความเข้มข้น 100 เท่า (100Xdenhardt solution)

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

#### 7.5 สารละลายพรีไฮบริไดเซชัน (pre-hybridization)

20XSSC	1.0	มิลลิลิตร
50Xdenhardt Solution	1.0	มิลลิลิตร
Denatured salmon DNA (10 mg/ml)	0.01	กรัม
TE buffer	1.0	มิลลิลิตร
Formamide	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.9	มิลลิลิตร

ชั่ง denatured salmon DNA ปริมาณ 0.01 กรัม ใส่ใน TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว การทำผสมด้วยเครื่องกำเนิดเสียง (sonicator) นาน 3 นาที ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร เติม 20XSSC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 50Xdenhardt Solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วย formamide ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

#### 7.6 สารละลายซาลีนโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 20 เท่า (20xSSC)

NaCl	175.3	กรัม
Tri-sodium citrate.2H <sub>2</sub> O	88.2	กรัม

ชั่ง NaCl ปริมาณ 175.3 กรัม และ Tri-sodium citrate.2H<sub>2</sub>O ปริมาณ 88.2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างที่ 7.2 ด้วย 10M NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

### 7.7 สารละลายซาตินโซเดียมซเตรคความเข้มข้น 0.2 เท่า (0.2xSSC)

20xSSC	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	98	มิลลิลิตร

### 7.8 สารละลาย streptavidin- $\beta$ -D-galactosidase

streptavidin- $\beta$ -D-galactosidase	1	ไมโครลิตร
1XPBS	1	มิลลิลิตร
BSA (fraction V)	0.5	มิลลิกรัม
Triton X-100	1	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (ความเข้มข้น 2 โมลาร์)	1	ไมโครลิตร

ชั่ง BSA ใส่ใน 1XPBS เติม Triton X-100 และ MgCl<sub>2</sub> ผสมให้เข้ากันเบาๆ เก็บไว้สำหรับเป็น stock หากต้องการใช้ให้ใส่ streptavidin- $\beta$ -D-galactosidase ก่อนนำไปใช้เท่านั้น

### 7.9 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาติน ความเข้มข้น 2 เท่า (phosphate-buffered saline, 2XPBS)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (8 mM)	1.15	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.5 mM)	0.2	กรัม
NaCl (137 mM)	8.0	กรัม
KCl (2.7 mM)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

pH = 7.0

ชั่งสารข้างต้นใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนนำไปใช้

### 7.10 สารละลายกรดซัลฟูริก 2 โมลาร์ (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

กรดซัลฟูริก	21.9	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	178.1	ไมโครลิตร

### 7.11 Solution I (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) (detection by colorimetric method)

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

**7.12 Solution II (ปริมาตร 4 มิลลิลิตร) (detection by colorimetric method)**

Streptavidin POD	1	ไมโครลิตร
Solution I	4	มิลลิลิตร

**7.13 Solution III (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) (detection by colorimetric method)**

TMB (10 mg/ml in DMFO)	100	ไมโครลิตร
0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	ไมโครลิตร
0.1M Citric acid in 10%DMFO		
+ 0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> buffer pH 6.2	5	มิลลิลิตร

**8. สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา (reagent) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging method****8.1 สารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์**

DPPH	1.6	กรัม
เมทานอล	20	มิลลิลิตร

กระดาษกรอง whatman no.1

ชั่ง DPPH 1.6 มิลลิกรัมละลายในเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 อย่างรวดเร็ว เก็บให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## ภาคผนวก ค

### ลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละกลุ่ม

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
MW4-27	ISP2	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP3	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	White	Pale Yellow	-
	ISP7	น้อย	Yellowish White	Light Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	น้อย	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP6	น้อย	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
MW7-26	ISP2	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP3	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP4	น้อย	White	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Light Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	น้อย	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
MW8-7	ISP2	ปานกลาง	Light Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP3	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Light Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	N.A.	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	น้อย	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW8-21	ISP2	ปานกลาง	Light Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP3	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	White	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Light Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	น้อย	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
MW10-7	ISP2	ปานกลาง	Light Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP3	น้อย	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP4	น้อย	White	Pale Yellow	-
	ISP7	น้อย	Yellowish White	Light Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	น้อย	Pale Yellow	Pale Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 2 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-35	ISP2	ดีมาก	Pale Yellow	White	-
	ISP3	ดี	White	Light Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP6	ดี	Pale Yellow	Moderate Yellow	-
MW6-2	ISP2	ดี	Pale Yellow	White	-
	ISP3	ดี	White	Light Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP6	ดี	Pale Yellow	Moderate Yellow	-
MW12-20	ISP2	ดีมาก	Pale Yellow	White	-
	ISP3	ดีมาก	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP5	ดี	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP6	ดีมาก	Pale Yellow	Moderate Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW1-2	ISP2	ดีมาก	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ดี	Light Orange Yellow	Strong Yellowish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange	Strong Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Dark Grayish Reddish Brown	Dark Grayish Reddish Brown	-
	ISP5	น้อย	Strong Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Strong Orange	Strong Orange	-
	N.A.	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Orange Yellow	Deep Orange Yellow	-
MW2-5	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Strong Yellowish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange	Vivid Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Dark Grayish Reddish Brown	Dark Grayish Reddish Brown	-
	ISP5	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	N.A.	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Orange Yellow	Deep Orange Yellow	-
MW2-24	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ดี	Light Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange	Vivid Orange	-
	ISP7	ดี	Dark Grayish Reddish Brown	Dark Grayish Reddish Brown	-
	ISP5	น้อย	Strong Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	N.A.	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Orange Yellow	Deep Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-5	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Strong Yellowish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Vivid Orange	Vivid Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Dark Grayish Reddish Brown	Dark Grayish Reddish Brown	-
	ISP5	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	N.A.	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Orange Yellow	Deep Orange Yellow	-
MW10-14	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Strong Yellowish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange	Vivid Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP5	น้อย	Strong Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	N.A.	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP6	น้อย	Deep Orange Yellow	Deep Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 4 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-8	ISP2	ปานกลาง	Vivid Red	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Light Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray	Brownish Gray	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Vivid Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Grayish Yellowish Pink	Grayish Yellowish Pink	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Strong Yellowish Brown	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW4-39	ISP2	น้อย	Vivid Red	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray	Light Orange	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Vivid Orange Yellow	-
	Glu.A.	น้อย	Moderate Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Grayish Yellowish Pink	Grayish Yellowish Pink	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Strong Yellowish Brown	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW10-12	ISP2	น้อย	Vivid Red	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Light Orange Yellow	-
	ISP4	คี่	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray	Light Orange	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Vivid Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Grayish Yellowish Pink	Grayish Yellowish Pink	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	Strong Yellowish Brown	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 4 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW11-1	ISP2	ปานกลาง	Vivid Red	-	-
	ISP3	ดี	Strong Yellowish Brown	Light Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray	Moderate Orange	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Vivid Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Grayish Yellowish Pink	Grayish Yellowish Pink	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Moderate Yellowish Brown	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 5 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW2-6	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Grayish Brown	Grayish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Brown	Moderate Brown	-
MW6-40	ISP2	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Deep Brown	Deep Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Brown	Moderate Brown	-
MW10-13	ISP2	ดี	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Deep Brown	Grayish Brown	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ดี	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Brown	Moderate Brown	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 6 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW1-4	ISP2	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	-	Moderate Violet
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	น้อย	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Brownish Gray	-
	ISP6	น้อย	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
MW2-4	ISP2	ดี	Grayish Reddish Orange	-	Moderate Violet
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Brownish Gray	-
	ISP6	น้อย	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
MW6-20	ISP2	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	-	Strong Violet
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	น้อย	Strong Orange	Moderate Orange	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Brownish Gray	-
	ISP6	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 6 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW12-5	ISP2	ดี	Grayish Reddish Orange	-	Strong Violet
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	น้อย	Moderate Orange	Light Orange	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Brownish Gray	-
	ISP6	น้อย	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
MW13-10	ISP2	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	-	Moderate Violet
	ISP3	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Brownish Gray	-
	ISP6	น้อย	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 7 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-1	ISP2	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	น้อย	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pinkish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	Strong Purple	Strong Purple	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	Grayish Reddish Orange	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW7-6	ISP2	น้อย	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Deep Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Red	Moderate Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pinkish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	Moderate Purple	Moderate Purple	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	Grayish Reddish Orange	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW12-1	ISP2	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	น้อย	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Deep Red	Moderate Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pinkish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	Moderate Purple	Moderate Purple	-
	N.A.	น้อย	Grayish Reddish Orange	Grayish Reddish Orange	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 7 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW13-5	ISP2	น้อย	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pinkish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	Moderate Purple	Moderate Purple	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Reddish Orange	Grayish Reddish Orange	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 8 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW1-12	ISP2	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
MW2-25	ISP2	ปานกลาง	Moderate Orange	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
MW6-35	ISP2	น้อย	Moderate Orange	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 8 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW6-46	ISP2	ปานกลาง	Moderate Orange	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate g Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ดี	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
MW13-6	ISP2	ปานกลาง	Moderate Orange	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP4	ดี	Strong Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	ISP7	ดี	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	น้อย	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 9 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-36	ISP2	ปานกลาง	Brilliant Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Vivid Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
MW5-17	ISP2	ดี	Brilliant Orange Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	น้อย	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
MW7-16	ISP2	ปานกลาง	Light Orange Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Orange Yellow	Moderate Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Vivid Orange Yellow	Strong Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Light Orange Yellow	Light Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 10 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-1	ISP2	น้อย	Light Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Light Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	ปานกลาง	Vivid Yellow	Vivid Yellow	-
	ISP6	น้อย	Brilliant Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
MW5-25	ISP2	น้อย	Brilliant Yellow	-	-
	ISP3	ดี	Brilliant Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Light Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	ปานกลาง	Vivid Yellow	Vivid Yellow	-
	ISP6	น้อย	Brilliant Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
MW6-8	ISP2	น้อย	Light Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Light Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Glu.A.	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	N.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP6	น้อย	Brilliant Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 10 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW11-14	ISP2	น้อย	Brilliant Yellow	-	-
	ISP3	ดี	Brilliant Yellow	Brilliant Orange Yellow	-
	ISP4	น้อย	Brilliant Yellow	Light Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Brilliant Yellow	Brilliant Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Yellow	Light Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	N.A.	น้อย	Light Yellow	Light Yellow	-
	ISP6	น้อย	Brilliant Orange Yellow	Brilliant Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคทีโนมัยซีทกลุ่มที่ 11 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW1-18	ISP2	ปานกลาง	Dark Yellowish Brown	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Yellowish Brown	Yellowish White	-
	ISP4	ปานกลาง	Vivid Yellowish Pink	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP7	น้อย	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	ISP5	น้อย	Moderate Yellowish Pink	Pale Yellowish Pink	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Yellowish Brown	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	N.A.	น้อย	Strong Reddish Brown	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW3-11	ISP2	น้อย	Reddish Black	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Yellowish Brown	Yellowish White	-
	ISP4	ปานกลาง	Vivid Yellowish Pink	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP7	น้อย	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	ISP5	น้อย	Moderate Yellowish Pink	Pale Yellowish Pink	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Dark Yellowish Brown	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	น้อย	Strong Reddish Brown	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW7-7	ISP2	น้อย	Reddish Black	-	-
	ISP3	น้อย	Moderate Yellowish Brown	Moderate Yellowish Brown	-
	ISP4	น้อย	Moderate Yellowish Pink	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP7	น้อย	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	ISP5	น้อย	Moderate Yellowish Pink	Pale Yellowish Pink	-
	Glu.A.	น้อย	Moderate Yellowish Brown	Moderate Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	น้อย	Strong Reddish Brown	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 11 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW11-11	ISP2	ปานกลาง	Strong Yellowish Brown	-	-
	ISP3	น้อย	Strong Yellowish Brown	Yellowish White	-
	ISP4	ปานกลาง	Vivid Yellowish Pink	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP7	น้อย	Light Yellowish Pink	Light Yellowish Pink	-
	ISP5	น้อย	Pale Yellowish Pink	Pale Yellowish Pink	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pale Yellowish Pink	Pale Yellowish Pink	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	น้อย	Strong Reddish Brown	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 12 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-15	ISP2	น้อย	Pale Greenish Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP5	น้อย	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-
MW5-16	ISP2	น้อย	Pale Greenish Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ดีมาก	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP5	น้อย	Colorless	Colorless	-
	Glu.A.	ดี	White	White	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-
MW8-40	ISP2	น้อย	Pale Greenish Yellow	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ดี	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP5	น้อย	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	Glu.A.	ดี	White	White	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 13 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-45	ISP2	น้อย	Brownish Orange	Brownish Orange	-
	ISP3	ปานกลาง	Dark red	Dark Red	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Deep Red	Vivid Red	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Red	Moderate Red	-
	Glu.A.	น้อย	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	Deep Yellow Pink
	N.A.	ดี	Dark Red	Deep Red	-
	ISP6	น้อย	Deep Red	Deep Red	-
MW5-8	ISP2	ปานกลาง	Brownish Orange	Brownish Orange	-
	ISP3	ปานกลาง	Blackish Red	Dark Red	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Dark Red	Dark Red	-
	ISP5	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	Moderate Yellow Pink
	N.A.	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 13 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW5-9	ISP2	ปานกลาง	Brownish Orange	Brownish Orange	-
	ISP3	ปานกลาง	Blackish Red	Dark Red	-
	ISP4	ดี	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Dark Red	Dark Red	-
	ISP5	ปานกลาง	Dark Red	Dark Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	Moderate Yellow Pink
	N.A.	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
MW7-20	ISP2	น้อย	Brownish Orange	Brownish Orange	-
	ISP3	ปานกลาง	Blackish Red	Dark Red	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Deep Red	Vivid Red	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Red	Moderate Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	Dark Yellow Pink
	N.A.	ดี	Deep Red	Deep Red	-
	ISP6	น้อย	Deep Red	Deep Red	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 13 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW12-13	ISP2	ปานกลาง	Brownish Orange	Brownish Orange	-
	ISP3	ปานกลาง	Blackish Red	Dark Red	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Orange	Moderate Orange	-
	ISP7	ปานกลาง	Vivid Red	Vivid Red	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Red	Moderate Red	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Moderate Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	Vivid Yellow Pink
	N.A.	ปานกลาง	Deep Red	Deep Red	-
	ISP6	น้อย	Vivid Red	Vivid Red	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 14 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-17	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP4	ดี	White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP5	ปานกลาง	White	White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ดี	White	White	-
	N.A.	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-
MW10-3	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP4	ปานกลาง	White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	White	White	-
	ISP5	ปานกลาง	White	White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ดี	White	White	-
	N.A.	ไม่เจริญ	-	-	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-
MW13-13	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP4	ดี	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP5	ปานกลาง	White	White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ไม่เจริญ	-	-	-
	ISP6	น้อย	Colorless	Colorless	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 15 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ
MW2-29	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	น้อย	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP4	ดีมาก	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP5	ไม่เจริญ	-	-	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW7-23	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	น้อย	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ดีมาก	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP5	ไม่เจริญ	-	-	-
	Glu.A.	ดี	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
MW8-55	ISP2	ปานกลาง	Yellowish White	-	-
	ISP3	น้อย	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	White	White	-
	ISP5	ไม่เจริญ	-	-	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท์กลุ่มที่ 15 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW10-19	ISP2	น้อย	Yellowish White	-	-
	ISP3	น้อย	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	ISP4	ดี	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP5	ไม่เจริญ	-	-	-
	Glu.A.	ดี	Yellowish White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 16 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-46	ISP2	น้อย	Yellowish White	-	-
	ปานกลาง	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	น้อย	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Yellowish Yellow	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Dark Yellow	-
MW10-8	ISP2	น้อย	Yellowish White	-	-
	ปานกลาง	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP4	ดี	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Grayish Yellow	Dark Grayish Yellow	-
MW10-11	ISP2	น้อย	Yellowish White	-	-
	ปานกลาง	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP4	ดี	Moderate Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	น้อย	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Yellow	Yellowish White	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Dark Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Dark Grayish Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคทีโนมัยซีทกลุ่มที่ 17 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW4-9	ISP2	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP3	ปานกลาง	White	White	-
	ISP4	ปานกลาง	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
MW6-5	ISP2	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP3	ดี	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
MW8-8	ISP2	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP3	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทกลุ่มที่ 17 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW12-16	ISP2	ดี	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP3	ปานกลาง	Pale Yellow	White	-
	ISP4	ปานกลาง	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	น้อย	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
MW12-18	ISP2	ดีมาก	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP3	ปานกลาง	White	Pale Yellow	-
	ISP4	ปานกลาง	White	White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Pale Orange Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Orange Yellow	Light Orange Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Pinkish White	Pale Orange Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 18 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW1-15	ISP2	น้อย	Dark Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Grayish Yellow	Pale Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Pale Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Yellow	Deep Yellow	-
MW6-17	ISP2	น้อย	Dark Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	น้อย	Moderate Yellow	Pale Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Deep Yellow	Deep Yellow	-
MW7-30	ISP2	น้อย	Pale Yellow	-	-
	ISP3	น้อย	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP7	ปานกลาง	Grayish Yellow	Pale Yellow	-
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	Glu.A.	น้อย	Moderate Yellow	Pale Yellow	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Pale Yellow	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Grayish Yellow	Grayish Yellow	-
	ISP6	น้อย	Deep Yellow	Pale Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทกลุ่ม 19 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW2-19	ISP2	ดี	Moderate Olive Brown	Light Olive Brown	-
	ISP3	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ปานกลาง	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Light Grayish Olive	Light Grayish Olive	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Glu.A.	ดี	Light Grayish Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Light Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Deep Yellow	-
MW2-22	ISP2	ดี	Moderate Olive Brown	Light Olive Brown	-
	ISP3	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ดี	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Olive	Light Grayish Olive	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Glu.A.	ดี	Light Grayish Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ดี	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Light Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Deep Yellow	-

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนไมซีทกลุ่มที่ 19 บนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP)  
ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system) (ต่อ)

รหัส	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร	สีของเส้นใยอากาศ	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ
MW3-23	ISP2	ปานกลาง	Moderate Olive Brown	Moderate Olive Brown	-
	ISP3	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ดี	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Olive	Light Grayish Olive	-
	ISP5	ปานกลาง	Light Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Grayish Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Light Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Deep Yellow	-
MW8-44	ISP2	ปานกลาง	Moderate Olive Brown	Light Olive Brown	-
	ISP3	ปานกลาง	Colorless	Colorless	-
	ISP4	ดี	Pale Yellow	Pale Yellow	-
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Olive	Light Olive	-
	ISP5	ปานกลาง	Moderate Yellowish Brown	Light Yellowish Brown	-
	Glu.A.	ปานกลาง	Light Grayish Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	White	White	-
	N.A.	ปานกลาง	Moderate Yellow	Moderate Yellow	-
	ISP6	ปานกลาง	Dark Yellow	Deep Yellow	-

หมายเหตุ

ISP2 = Yeast extract-malt extract agar

ISP3 = Oatmeal agar

ISP4 = Inorganic salts-starch agar

ISP5 = Glycerol asparagine agar

ISP6 = Peptone-yeast extract iron agar

ISP7 = Tyrosine agar

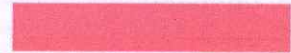



























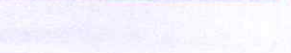
Glu.A. = Glucose asparagine agar

N.A. = Nutrient agar

Cz.sucrose = Czapek's sucrose agar

## The NBS/IBCC Color System

### The 267 Color Centroids

Munsell		RGB	Swatch
<b>Red, Pink</b>			
<b>1 Vivid Pink</b>	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
<b>2 Strong Pink</b>	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
<b>3 Deep Pink</b>	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
<b>4 Light Pink</b>	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
<b>5 Moderate Pink</b>	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
<b>6 Dark Pink</b>	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
<b>7 Pale Pink</b>	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
<b>8 Grayish Pink</b>	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
<b>9 Pinkish White</b>	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
<b>10 Pinkish Gray</b>	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
<b>11 Vivid Red</b>	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
<b>12 Strong Red</b>	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
<b>13 Deep Red</b>	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
<b>14 Very Deep Red</b>	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
<b>15 Moderate Red</b>	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
<b>16 Dark Red</b>	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
<b>17 Very Dark Red</b>	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
<b>18 Light Grayish Red</b>	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
<b>19 Grayish Red</b>	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
<b>20 Dark Grayish Red</b>	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
<b>21 Blackish Red</b>	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
<b>22 Reddish Gray</b>	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
<b>23 Dark Reddish Gray</b>	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
<b>24 Reddish Black</b>	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
<b>Yellowish Pink</b>			
<b>25 Vivid Yellowish Pink</b>	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
<b>26 Strong Yellowish Pink</b>	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
<b>27 Deep Yellowish Pink</b>	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
<b>28 Light Yellowish Pink</b>	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
<b>29 Moderate Yellowish Pink</b>	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	
<b>Reddish Orange, Reddish Brown</b>			
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	
<b>Orange Brown</b>			
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	

<b>63 Light Brownish Gray</b>	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
<b>64 Brownish Gray</b>	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
<b>65 Brownish Black</b>	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
<b>Orange Yellow, Yellowish Brown</b>			
<b>66 Vivid Orange Yellow</b>	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
<b>67 Brilliant Orange Yellow</b>	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
<b>68 Strong Orange Yellow</b>	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
<b>69 Deep Orange Yellow</b>	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	
<b>70 Light Orange Yellow</b>	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
<b>71 Moderate Orange Yellow</b>	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
<b>72 Dark Orange Yellow</b>	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
<b>73 Pale Orange Yellow</b>	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
<b>74 Strong Yellowish Brown</b>	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
<b>75 Deep Yellowish Brown</b>	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
<b>76 Light Yellowish Brown</b>	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
<b>77 Moderate Yellowish Brown</b>	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
<b>78 Dark Yellowish Brown</b>	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
<b>79 Light Grayish Yellowish Brown</b>	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
<b>80 Grayish Yellowish Brown</b>	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
<b>81 Dark Grayish Yellowish Brown</b>	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
<b>Yellow, Olive Brown</b>			
<b>82 Vivid Yellow</b>	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
<b>83 Brilliant Yellow</b>	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
<b>84 Strong Yellow</b>	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
<b>85 Deep Yellow</b>	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
<b>86 Light Yellow</b>	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
<b>87 Moderate Yellow</b>	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
<b>88 Dark Yellow</b>	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
<b>89 Pale Yellow</b>	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
<b>90 Grayish Yellow</b>	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
<b>91 Dark Grayish Yellow</b>	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
<b>92 Yellowish White</b>	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
<b>93 Yellowish Gray</b>	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
<b>94 Light Olive Brown</b>	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
<b>95 Moderate Olive Brown</b>	2.7y 3.6 5.5	#64400F	










<b>96 Dark Olive Brown</b>	2.0y 1.9 2.2	#302112	
<b>Greenish Yellow, Olive</b>			
<b>97 Vivid Greenish Yellow</b>	9.1y 8.2 12.0	#F4C800	
<b>98 Brilliant Greenish Yellow</b>	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33	
<b>99 Strong Greenish Yellow</b>	9.2y 7.2 9.2	#CCA817	
<b>100 Deep Greenish Yellow</b>	9.2y 5.9 9.2	#9F8200	
<b>101 Light Greenish Yellow</b>	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A	
<b>102 Moderate Greenish Yellow</b>	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D	
<b>103 Dark Greenish Yellow</b>	9.4y 5.9 6.3	#9B8127	
<b>104 Pale Greenish Yellow</b>	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84	
<b>105 Grayish Greenish Yellow</b>	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F	
<b>106 Light Olive</b>	8.2y 5.1 5.6	#846A20	
<b>107 Moderate Olive</b>	7.6y 3.8 5.4	#5E490F	
<b>108 Dark Olive</b>	8.9y 2.4 3.1	#362C12	
<b>109 Light Grayish Olive</b>	7.85y 5.5 2.5	#8B734B	
<b>110 Grayish Olive</b>	8.0y 3.6 2.0	#52442C	
<b>111 Dark Grayish Olive</b>	9.7y 2.0 1.8	#2B2517	
<b>112 Light Olive Gray</b>	6.9y 5.5 1.3	#887359	
<b>113 Olive Gray</b>	8.1y 3.5 0.9	#4D4234	
<b>114 Olive Black</b>	9.0y 1.1 0.9	#121910	
<b>Yellow Green, Olive Green</b>			
<b>115 Vivid Yellowish Green</b>	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
<b>116 Brilliant Yellow Green</b>	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
<b>117 Strong Yellow Green</b>	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
<b>118 Deep Yellow Green</b>	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
<b>119 Light Yellow Green</b>	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
<b>120 Moderate Yellow Green</b>	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
<b>121 Pale Yellowish Green</b>	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
<b>122 Grayish Yellowish Green</b>	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
<b>123 Strong Olive Green</b>	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
<b>124 Deep Olive Green</b>	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
<b>125 Moderate Olive Green</b>	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
<b>126 Dark Olive Green</b>	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
<b>127 Grayish Olive Green</b>	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
<b>128 Dark Grayish Olive Green</b>	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	

129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
<b>Yellowish Green</b>			
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	
<b>Green</b>			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
<b>Bluish Green</b>			
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	
<b>Greenish Blue</b>			
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	
<b>Blue</b>			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	

<b>Purplish Blue</b>			
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	
<b>Violet</b>			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
<b>Purple</b>			
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	
<b>Reddish Purple</b>			
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	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
<b>Purplish Pink, Purplish Red</b>			
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	

<b>259 Dark Purplish Red</b>	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
<b>260 Very Dark Purplish Red</b>	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
<b>261 Light Grayish Purplish Red</b>	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
<b>262 Grayish Purplish Red</b>	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
<b>263 White</b>	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
<b>264 Light Gray</b>	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
<b>265 Medium Gray</b>	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
<b>266 Dark Gray</b>	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
<b>267 Black</b>	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

## ภาคผนวก ง

### ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW1-15

AAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTC  
TGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCGCCCCGGCATCGGGTGGTGGTG  
GAAAGTCTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCCTACC  
AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCG  
CGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTG  
CAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGCTCGCAGCTTA  
ACTGCGGGTCTGCGGTGGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGAACGGAATTCCTGGTGT  
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCTTACCT  
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAA  
CGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATCTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCC  
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGG  
AGCATGTTGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCGCCCGAAAGCT  
GCAGAGATGTGGCCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCT  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTGCTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGG  
GGTGGTGGGGACTCATGGGGACTGCCGGGTCAACTCGGAGAAGGTGGGGATGACTCAAGTCAT  
CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTG  
AGGTGGAGCGAATCC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW2-5

ATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGC  
AACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAGGACCTGACCCC  
GCATGGGGTTGGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGG  
GGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTG  
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAG  
CGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGT  
AGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTGACT  
GTGAAAACCCGACGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGA  
GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG  
GGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGCAG  
CTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG  
GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTT  
TGACATGGCCGCAAAACTCACAGAGATGTGAGGTCCTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGC  
TGTCGTACAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW2-22

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAG  
 CGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGG  
 GTCTAATACCGGATATGACCGTCTCCGGCATCGGGTGACGGTGGAAAGATTTTTTGGTTCGGGGAT  
 GGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGC  
 CTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
 GGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGG  
 GTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGGTGACGTGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC  
 TCGTAGGTGGCTGGTTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGCAGCTTAACTGCGGGTCTGCGGTGGATAC  
 GGGCCGGCTAGAGGTAGGTAGGGGCAAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
 AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGG  
 TCTTCCACGATCTCCGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG  
 GCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGC  
 AACCGGAAGAACCTTACCAAGGTTTACATCACCCGGACACCTGCAGAGATGTGGGCTTCTTCGG  
 ACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW2-25

TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCT  
 TCGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAA  
 CCCTCGGAAACGGGGCTAATACCGGATATTCATTCTCCACGGCATCGTGGGGTGTGGAAAGTTT  
 TTTCCGCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGAC  
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
 GGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGG  
 ATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTACGGTACCTGGAGA  
 AGAAGCGCCGGCCAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAT  
 TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGTCAGCTGTGAAAACCCGCGAGCTCAACTG  
 TGGGCTTGCAGCTGATACGGGCAGGCTTGAAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG  
 GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACG  
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTT  
 GGGCGCTAGGTGTGGGGGGCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCGACTAACGCATTAAGCGCCCCGCC  
 TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGC  
 ATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGTACATGGGCGCTAAAGCAGCA  
 GAGATGTTGTGTCTTTCGGGGCGTTTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGCGT  
 ATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCTTGTTCGATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGG  
 ACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCC  
 TTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGA  
 GCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAG  
 TCGTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
 GTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGA  
 AAGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGT

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW3-11

CCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGA  
 TAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACACCTCCTGGCATCGGGTGGGTGTGGAAAG  
 TTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG  
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGG  
 GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGCAGAAG  
 AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATT  
 ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTACGTCGGGTGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCA  
 GGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGAACGGAATTCCTGGTGTAGCGGT

GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCTTACCTGACGCT  
 GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGG  
 GCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGG  
 GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATG  
 TTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCGCCCGAAACACTCAGAG  
 ATGGGTGCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCAATGTTGCCAGCACGCTCCTTTGGGGGTG  
 GTGGGGACTCATTGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACTCAAGTCATCAT  
 GCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGCAAGG  
 TGGAGCGAATCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTTGAATGGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG  
 GATCCCTAGTAATCCAGATCAGCACCCCTCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTC AACCCCGGTT  
 CCGTTCCCAAATTGGAAACCCCAAAGCCCGGGGCCACCGTTTTTTGGGGGAAAGCTCAAAGGT  
 GGGGCTTGCGGATTGGACCAAATCTTAACAAGGAAA

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW3-17**

GTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTG  
 CCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACACCTCCCTGCATGG  
 GGTGGGTGTGAAAGTTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTA  
 GTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA  
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGC  
 AGCGACGCCCGGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGA  
 CGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCA  
 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTCGCTGTCGCGTGAAAGC  
 CCGTGGCTTAACTGCGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAA  
 TTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTG  
 GGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC  
 ACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCATGGTTCTGTGCCGTAGCTAACGCAT  
 TAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCA  
 CAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATCAC  
 CCGGAAACCTCCAGAGATGGGGGCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG  
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCA  
 CGCTCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAAGAAGGTGGGGATG  
 ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCCGTACAGAGGG  
 TTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGA

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW4-35**

CAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCA  
 ACCTACCCTCAACTTTGGGATAAGCCTCGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAATACTTCGCTCCT  
 CATGGGGTGGGGTTGAAAGTTCTGGCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGG  
 GGTAATGGCCTACCAAGGCGTGCACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT  
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGACGAAAGTCTG  
 ACGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAG  
 CGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
 AGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTGTCACGTCGCGGA  
 GTGAAAACCTCGGGGCTTAAACCCGAGCCTGCTTCCGATACGGGCAGACTAGAGGTAGGCAGGGGA  
 GAGCGGAACTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCG  
 GCTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCT  
 GGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACATTCCACGTCCTCCGTGCCGCGAG  
 CTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG  
 GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTT  
 TGACATATAGGAAATCTCGCAGAGATGCGGGTCCGTAAGGGTCTTACAGGTGGTGCATGGC  
 TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGAGAT

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW4-36

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGG  
 CCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTAGGCTTTGGG  
 ATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAATACCGGATATTCATTCTTCACGGCATCGTGGGGTGTGGAAA  
 GTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGC  
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA  
 GGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGG  
 AGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGTCAGCTGTGAAAACCCGCAGCTCAA  
 CTGTGGGCTTGCAGCTGATACGGGCAGGCTTGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTG  
 GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTG  
 ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAAC  
 GTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTCTCTGTGCCGACGTAACGCATTAAGCGCCC  
 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCG  
 GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGGCGCTAAAAC  
 CGTAGAGATACGGTGTCTTCGGGGGCGTTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCG  
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCGATGTTGCCAGCGGGTTATGCC  
 GGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG  
 CCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATAACCGTGAGG  
 TGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTC  
 GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC  
 GCCCGTCACGTTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCT  
 TAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCGCCCGGAAACACTCAGAGATGGG  
 TGCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG  
 TT

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW5-16

CCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGG  
 ATAAGCCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACACCTCCCTGCATGGGGTGGGTGTGGAAA  
 GTTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGC  
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGG  
 GGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGCAGAA  
 GAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAAT  
 TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTACGTCGGGTGTGAAAGCTTGGGGCTTAACTCC  
 AGGTCTGCATTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGAACGGAATTCCTGGTGTAGCGG  
 TGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCCCTTACCTGACGC  
 TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTG  
 GCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCACGGTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTG  
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT  
 GTTGTCTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGCATTGCCCGGAAACACTCAGA  
 GATGGGTGCCTCTTCGGATCGGGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGAT  
 GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCAATGTTGCCAGCACGCTCTTTCGGGGGT  
 GGTGGGGACTCATTGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC  
 ATGCCCTTATGCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATAACCGCA  
 AGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA  
 GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
 CCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCAGCTTGTGGGGGA  
 GCACCAAGGGGTGGCAATGGACAAATCTAACCAGGGTAAAA

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW5-25**

TCGAGCGGAAAGGCCTTTCGGGGTACTCGAGCGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGC  
 CCCTGGCTTTGGGATAACCATCGGAAACGGTGGCTAATACCGAATATTCACCTTCGGGTTCGCATGA  
 CCTGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCTGGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTGAT  
 GGCCTACCAAGGCTTTGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACA  
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAG  
 CGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGAAAG  
 TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCG  
 CGAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCTCGTCCGTGAAA  
 ACCTGGGGCTCAACTCCAGGCTTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGG  
 AATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTC  
 TGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  
 CCACGCTGTAAACGTTGGGCGTAGGTGTGGGGGCTCTCCGTTTTCTGCGCCGTAGCTAACG  
 CATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
 GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCGACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACAT  
 GGCCGTTAAAGCCGTAGAGATACGGTGTCTTCGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGT  
 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCA  
 GCGGGTAATGCCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAAGAAGGTGGGGATGACGT  
 CAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGC  
 GATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW7-20**

TAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACACCTCCT  
 GGCATCGGGTGGGTGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCCATCAGCTTGTGG  
 TGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGG  
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGC  
 CTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACG  
 AAGTTGACGTGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
 GGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTACGTCGGGTG  
 TGAAAGCTTGGGGCTTAACTCCAGGTCTGCATTTCGATACGGGCTGGCTAGAGGTAGGTAGGGGAG  
 AACGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG  
 TTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG  
 GTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCTTCCACGGTTTCCGCGCCGTAGCT  
 AACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACTGGG  
 GCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG  
 ACATCGCCGGAACACTCAGAGATGGGTGCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTG  
 TCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCATGTT  
 GCCAGCACGCCTCTT

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW7-23**

CTTCGGGGTACTCGAGCGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGAT  
 AAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACACCTCCTGGCATCGGGTGGGTGTGGAAAGT  
 TTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGGCG  
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACCGCCGCTGGG  
 GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAG  
 AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATT  
 ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTCGCTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTGCG  
 GGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCT  
 GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGG

GCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCATGGTCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCCTG  
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT  
 GTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGTTTGACATCACCCGAAACATCCAGA  
 GATGGGTGCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGAT  
 GTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCTCTTCGGGGTGG  
 TGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT  
 GCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGTCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAG  
 GTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT  
 CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC  
 CGCCCGTCACGTCACGAAAGTCCGCAACACCCGAAGCCGTGCCCAACCAGCTTGCTGGGGGA  
 GCGGT

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW8-21

GTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTCAGC  
 TTCGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATAGGACACATGGCTGCATGGCTGTGTGT  
 GGAAAGTTTTTCGGCTGGGGATGGGCCCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTTAC  
 CAAGGCGGTGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCC  
 GCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCTTTTGTGACGGT  
 ACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGTGCAGCGGT  
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTCCGCTCGGCCGTGAAAACCTGGG  
 GCTTAACCTGAGCGTGCGGTGCATACGGGCATCACTTGAAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTC  
 TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCC  
 GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC  
 CGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCATTCCACGTTTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAA  
 GCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA  
 GCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTGACATGCACAG  
 GATTGCGGCAGAGATGTCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCT  
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTT

#### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW10-11

AAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACT  
 CTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATGTGACGCTCTCCGGCATCGGATGGACGT  
 GGAAAGTTTTTCGGTACGGGATGGACTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCCTAC  
 CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCC  
 GCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCT  
 GTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTC  
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTCCGCTCTGCCGTGAAAGCCCATGGCTT  
 AACTATGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTG  
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTTC  
 TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAA  
 ACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTGCTTCCACGTGTCCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCC  
 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGC  
 GAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGTTTGACATCACCCGAAACG  
 GCCAGAGATGGTCCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCG  
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW10-12

CTTACCATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
 GTGAGCAACCTGCCCAAGCTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAATACCGAATAGGACTG  
 CTGGCCGCATGGCTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGT  
 TGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACT  
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGA  
 AGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG  
 ACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 AGACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGG  
 TCGACCGTGAAAACCTTGGGGCTCAACCCCAAGCCTGCGGTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGGT  
 AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG  
 AAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTG  
 CCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAAT  
 TGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACC  
 TGGGTTTGACATGGCCGCAAACCTCCAGAGATGGGGGGTCTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTG  
 CATG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW10-13

CTTACCATGCAAGTCGAGCGGAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACG  
 TGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAATACCGAATAGGACCTG  
 GCCTCGCATGAGGCTGGGTGGAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGT  
 GGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG  
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAA  
 GCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  
 CGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
 GACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGGT  
 CGACCGTGAAAACCTTGGGGCTCAACCCCAAGCCTGCGGTCCGAGGGGGGCTGCTGAGGCGAAGG  
 ATGGGATCTTGTCTTGGGGACGGTGATCGCCAGTGAGATCCCCTGcCAAAAAAGCGCGGATGA  
 TGTCGGGTTGGCGTCGAAAAGCTTGACGCGGTGATGAAGGTGTTATCTTTGAAAATGCACGAT  
 TTCGAGGGGCGGCAGGTTGTCAAAAAACCACCGTAATTGACGCCACGGCGAATGCGACGGCGG  
 GTA AAAACCTGTGAAAAGAGG

## ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW12-5

GGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTCGAGCAACCTGCCCAAG  
 CTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAATACCGAATATTACTGCTGGTCGCATGGCTGGTGG  
 TGAAAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTAC  
 CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCC  
 GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGT  
 ACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGTGCAGCGGT  
 TGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGACCGTGAAAACCTTGGG  
 GCTCAACCCCAAGCCTGCGGTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCT  
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCG  
 ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCT  
 GTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAG  
 CGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAG  
 CGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCA  
 AAACCTTCAGAGATGGGGGGTCTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCG  
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGCGTT  
 ATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA  
 TCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCG  
 TGAGGTGGAGCGAATCCCAAAA

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW12-18**

AACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCGTACTTCGGGTATAAGCCTGGGAAACTGGGTCT  
 AATACCGGATATGACCTTCTGATGCATGTCAGTGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC  
 CGCGGCCTATCAGCTTGTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAG  
 AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA  
 TATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT  
 AAACCTCTTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTAC  
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCT  
 TGTAGGCGGTTTCGTGCGCTCGTCTGTGAAAACCTCACAGCTCAACTGTGAGCTTGCAGGCGATACG  
 GCGGACTTGAGTACTTCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA  
 GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGG  
 GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTT  
 CCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG  
 GCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGC  
 AACCGGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGT  
 GGTGCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
 CAACGAGCGCAACCCTT

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA บางส่วนของไอโซเลต MW13-5**

CAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAAC  
 CTGCCCCAAGCTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGGGGCTAATACCGAATATTACTGTTGGCCGCA  
 TGGCTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT  
 GATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG  
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATG  
 CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGA  
 GAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGG  
 GTGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGACCGTG  
 AAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCCTGCGGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGAC  
 TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGT  
 CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT  
 AGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCGCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGAGCTA  
 ACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGG  
 CCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGA  
 CATGGCCGAAAACCTCCAGAGATGGGGGGTCTTCGGGGGCGG

## ภาคผนวก จ

### ระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทัวแทนในแต่ละกลุ่ม

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของเชื้อไฮโดรเลต MW8-21 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Pseudonocardia*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 MW8-21	100	96.2	97.1	84.2	97.8	94.3	96.1	97.1	94.4	98.6	95.6	94.5	98.8	94.7	94.7	94.5	94.1	90.8
2 <i>Pseudonocardia alni</i>	96.2	100	96.5	85.2	96.8	97.3	99.8	96.1	97.4	95.3	97.4	97.0	96.3	95.8	97.1	97.0	96.8	91.2
3 <i>Pseudonocardia ammonioxydans</i>	97.1	96.5	100	84.4	97.2	94.6	96.4	96.4	94.7	96.6	94.8	94.5	97.7	95.1	94.7	94.5	94.3	90.4
4 <i>Pseudonocardia aurantiaca</i>	84.2	85.2	84.4	100	84.4	84.9	85.1	83.9	84.9	83.5	85.1	85.2	84.3	84.0	85.4	85.0	85.2	82.7
5 <i>Pseudonocardia autotrophica</i>	97.8	96.8	97.2	84.4	100	94.6	96.7	99.2	94.7	97.1	95.5	94.3	99.0	95.5	94.8	94.3	94.2	90.2
6 <i>Pseudonocardia benzenivorans</i>	94.3	97.3	94.6	84.9	94.6	100	97.2	94.1	99.8	93.9	97.3	99.0	94.6	93.5	97.9	99.0	98.5	91.5
7 <i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	96.1	99.8	96.4	85.1	96.7	97.2	100	96.0	97.3	95.2	97.3	96.8	96.2	95.7	97.0	96.8	96.7	91.1
8 <i>Pseudonocardia compacta</i>	97.1	96.1	96.4	83.9	99.2	94.1	96.0	100	94.2	96.3	94.9	93.9	98.2	95.0	94.3	93.9	93.8	89.7
9 <i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	94.4	97.4	94.7	84.9	94.7	99.8	97.3	94.2	100	94	97.4	99.1	94.7	93.6	98.0	99.1	98.6	91.6
10 <i>Pseudonocardia endophytica</i>	98.6	95.3	96.6	83.5	97.1	93.9	95.2	96.3	94.0	100	94.8	93.6	98.0	94.2	94.1	93.6	93.2	89.8
11 <i>Pseudonocardia halophobica</i>	95.6	97.4	94.8	85.1	95.5	97.3	97.3	94.9	97.4	94.8	100	97.6	95.3	93.7	97.8	97.6	97.5	91.4
12 <i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i>	94.5	97.0	94.5	85.2	94.3	99.0	96.8	93.9	99.1	93.6	97.6	100	94.3	93.3	98.1	99.7	99.4	92.1
13 <i>Pseudonocardia kongjuensis</i>	98.8	96.3	97.7	84.3	99.0	94.6	96.2	98.2	94.7	98.0	95.3	94.3	100	95.0	94.8	94.3	93.8	90.6
14 <i>Pseudonocardia nitrificans</i>	94.7	95.8	95.1	84.0	95.5	93.5	95.7	95.0	93.6	94.2	93.7	93.3	95.0	100	93.6	93.3	93.2	90.9
15 <i>Pseudonocardia oroxyli</i>	94.7	97.1	94.7	85.4	94.8	97.9	97.0	94.3	98.0	94.1	97.8	98.1	94.8	93.6	100	98.1	97.6	91.3
16 <i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i>	94.5	97.0	94.5	85.0	94.3	99.0	96.8	93.9	99.1	93.6	97.6	99.7	94.3	93.3	98.1	100	99.2	91.9
17 <i>Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans</i>	94.1	96.8	94.3	85.2	94.2	98.5	96.7	93.8	98.6	93.2	97.5	99.4	93.8	93.2	97.6	99.2	100	91.7
18 <i>Pseudonocardia thermophila</i>	90.8	91.2	90.4	82.7	90.2	91.5	91.1	89.7	91.6	89.8	91.4	92.1	90.6	90.9	91.3	91.9	91.7	100

ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของเชื้อไฮโซเขต MW4-35 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Kribbella*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 MW4-35	100	97.8	98.6	97.8	97.4	98.1	98.6	98.9	97.4	97.5	97.1	97.7	98	98.2	97.6	89.2	91.0	90.1	90.8	91.8	90.2
2 <i>Kribbella alba</i>	97.8	100	98.1	97.7	98.2	98.8	97.8	97.7	97.8	98.2	98.0	97.7	97.2	97.4	97.6	89.1	91.3	90.1	90.2	91.7	90.3
3 <i>Kribbella aluminosa</i>	98.6	98.1	100	97.7	97.8	98.2	98.6	98.9	98.0	98.1	97.4	97.6	98	98.5	97.5	88.9	90.6	89.8	90.4	91.8	90.4
4 <i>Kribbella antibiotica</i>	97.8	97.7	97.7	100	97.1	97.9	97.6	97.5	97.6	98.0	97.0	97.6	97.0	96.8	97.7	89.0	91.5	90.3	90.2	91.4	90.3
5 <i>Kribbella catacumbae</i>	97.4	98.2	97.8	97.1	100	98.0	97.5	97.3	97.7	98.0	97.3	97.4	96.9	97.2	97.2	88.1	90.4	89.4	89.7	91.5	89.6
6 <i>Kribbella flavida</i>	98.1	98.8	98.2	97.9	98	100	98.6	98.1	98.3	97.9	98.1	98.2	98	97.6	98.1	89.6	91.3	90.2	90.7	92.0	90.5
7 <i>Kribbella hippodromi</i>	98.6	97.8	98.6	97.6	97.5	98.6	100	98.6	98.0	97.6	97.3	98.2	99.3	98.3	98.5	89.1	90.9	90.1	90.9	91.9	90.5
8 <i>Kribbella jejuensis</i>	98.9	97.7	98.9	97.5	97.3	98.1	98.6	100	97.8	97.6	97.0	97.7	98.0	98.5	97.6	88.6	90.7	90.2	90.3	91.6	90.0
9 <i>Kribbella karoensis</i>	97.4	97.8	98.0	97.6	97.7	98.3	98.0	97.8	100	97.7	97.6	98.0	97.4	97.7	97.7	88.2	90.2	89.7	89.5	91.1	89.5
10 <i>Kribbella koreensis</i>	97.5	98.2	98.1	98.0	98.0	97.9	97.6	97.6	97.7	100	97.4	97.6	97.0	97.3	97.5	89.0	90.9	90.3	90.3	91.8	90.2
11 <i>Kribbella lupini</i>	97.1	98.0	97.4	97.0	97.3	98.1	97.3	97.0	97.6	97.4	100	98.1	96.7	96.7	97.2	88.2	90.2	89.4	89.5	91.1	89.4
<i>Kribbella sandramycini</i>	97.7	97.7	97.6	97.6	97.4	98.2	98.2	97.7	98.0	97.6	98.1	100	97.6	97.2	98.4	88.4	90.4	89.8	89.7	91.4	89.5
13 <i>Kribbella solani</i>	98.0	97.2	98	97.0	96.9	98.0	99.3	98.0	97.4	97.0	96.7	97.6	100	97.7	97.9	88.6	90.4	89.6	90.4	91.4	90.0
<i>Kribbella swarbergensis</i>	98.2	97.4	98.5	96.8	97.2	97.6	98.3	98.5	97.7	97.3	96.7	97.2	97.7	100	97.2	88.7	90.3	90.5	90.4	91.6	89.8
15 <i>Kribbella yunnanensis</i>	97.6	97.6	97.5	97.7	97.2	98.1	98.5	97.6	97.7	97.5	97.2	98.4	97.9	97.2	100	88.9	90.9	90.3	90.2	91.1	90.0
16 <i>Nocardioides albus</i>	89.2	89.1	88.9	89.0	88.1	89.6	89.1	88.6	88.2	89.0	88.2	88.4	88.6	88.7	88.9	100	93.6	92.1	91.0	90.3	91.1
17 <i>Nocardioides basaltis</i>	91.0	91.3	90.6	91.5	90.4	91.3	90.9	90.7	90.2	90.9	90.2	90.4	90.4	90.3	90.9	93.6	100	95.3	92.1	92.7	91.9
<i>Nocardioides daphniae</i>	90.1	90.1	89.8	90.3	89.4	90.2	90.1	90.2	89.7	90.3	89.4	89.8	89.6	90.5	90.3	92.1	95.3	100	92.1	92.3	92.3
<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>	90.8	90.2	90.4	90.2	89.7	90.7	90.9	90.3	89.5	90.3	89.5	89.7	90.4	90.4	90.2	91.0	92.1	92.1	100	96.9	95.3
<i>Aeromicrobium erythreum</i>	91.8	91.7	91.8	91.4	91.5	92.0	91.9	91.6	91.1	91.8	91.1	91.4	91.4	91.6	91.1	90.3	92.7	92.3	96.9	100	95.3
21 <i>Aeromicrobioideisflava</i>	90.2	90.3	90.4	90.3	89.6	90.5	90.5	90.0	89.5	90.2	89.4	89.5	90.0	89.8	90.0	91.1	91.9	92.3	95.3	95.3	100

ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW2-5, MW10-12, MW10-13, MW12-5 และ MW13-5 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Micromonospora*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 MW2-5	100	96.4	97.2	95.8	95.8	97.1	97.7	95.8	98.3	97.4	98.7	98.7	97.1	98.7	96.4	96.6	99.0	97.5	99.2	96.0
2 MW10-12	96.4	100	98.1	99.3	99.2	98.5	97.4	99.3	96.1	98.1	96.3	95.8	97.9	95.6	98.7	98.5	96.3	98.3	96.0	99.3
3 MW10-13	97.2	98.1	100	98.0	97.6	99.1	98.1	98.0	96.3	99.7	97.1	97.0	99.5	96.7	98.1	98.5	97.2	99.1	96.9	98.0
4 MW12-5	95.8	99.3	98.0	100	99.6	98.1	97.0	100	96.5	98.0	96.4	95.6	97.7	95.4	99.1	98.2	95.6	98.0	95.5	99.7
5 MW13-5	95.8	99.2	97.6	99.6	100	98.0	97.1	99.6	96.3	97.6	96.1	95.5	97.6	95.1	99.0	98.0	95.6	97.9	95.8	99.6
6 <i>Micromonospora aurantiaca</i>	97.1	98.5	99.1	98.1	98	100	98.6	98.1	96.4	99.3	97.2	96.7	99.3	96.6	98.5	98.2	97.2	99.3	97.0	98.3
7 <i>Micromonospora chalconae</i>	97.7	97.4	98.1	97.0	97.1	98.6	100	97.0	97.1	98.3	97.9	97.4	98.1	96.7	97.4	97.1	98.0	98.0	97.4	97.2
8 <i>Micromonospora chokoriensis</i>	95.8	99.3	98.0	100	99.6	98.1	97.0	100	96.5	98.0	96.4	95.6	97.7	95.4	99.1	98.2	95.6	98.0	95.5	99.7
9 <i>Micromonospora coriariae</i>	98.3	96.1	96.3	96.5	96.3	96.4	97.1	96.5	100	96.4	98.8	98	96.1	98.0	96.9	96.1	97.6	96.3	97.7	96.5
10 <i>Micromonospora coxensis</i>	97.4	98.1	99.7	98.0	97.6	99.3	98.3	98.0	96.4	100	97.2	97.1	99.7	96.9	98.1	98.5	97.5	99.2	97.0	98.0
11 <i>Micromonospora endolithica</i>	98.7	96.3	97.1	96.4	96.1	97.2	97.9	96.4	98.8	97.2	100	98.6	97.0	98.6	96.5	96.5	98.1	97.0	98.2	96.4
12 <i>Micromonospora fulvivindis</i>	98.7	95.8	97.0	95.6	95.5	96.7	97.4	95.6	98.0	97.1	98.6	100	96.9	98.1	95.8	96.5	97.9	97.1	98.2	95.6
13 <i>Micromonospora halophytica</i>	97.1	97.9	99.5	97.7	97.6	99.3	98.1	97.7	96.1	99.7	97.0	96.9	100	96.9	97.9	98.2	97.2	99.2	97.2	97.7
14 <i>Micromonospora inositola</i>	98.7	95.6	96.7	95.4	95.1	96.6	96.7	95.4	98.0	96.9	98.6	98.1	96.9	100	95.8	96.1	98.0	97.0	98.2	95.4
15 <i>Micromonospora lupini</i>	96.4	98.7	98.1	99.1	99.0	98.5	97.4	99.1	96.9	98.1	96.5	95.8	97.9	95.8	100	98.2	96.3	98.3	96.1	99.3
16 <i>Micromonospora mirobrigensis</i>	96.6	98.5	98.5	98.2	98.0	98.2	97.1	98.2	96.1	98.5	96.5	96.5	98.2	96.1	98.2	100	96.3	98.6	96.3	98.1
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	99.0	96.3	97.2	95.6	95.6	97.2	98.0	95.6	97.6	97.5	98.1	97.9	97.2	98.0	96.3	96.3	100	97.1	98.6	95.9
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	97.5	98.3	99.1	98.0	97.9	99.3	98.0	98.0	96.3	99.2	97.0	97.1	99.2	97.0	98.3	98.6	97.1	100	97.2	98.2
19 <i>Micromonospora rosaria</i>	99.2	96.0	96.9	95.5	95.8	97.0	97.4	95.5	97.7	97.0	98.2	98.2	97.2	98.2	96.1	96.3	98.6	97.2	100	95.8
20 <i>Micromonospora saelicesensis</i>	96.0	99.3	98.0	99.7	99.6	98.3	97.2	99.7	96.5	98.0	96.4	95.6	97.7	95.4	99.3	98.1	95.9	98.2	95.8	100

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของ ไอ โซเลต MW2-25 และ MW4-36 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Dactylosporangium*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 MW 2-25	100	99.2	99.3	97.3	98.1	97.6	97.4	98.0	98.2	97.4	95.2	95.4	95.6
2 MW4-36	99.2	100	98.9	97.1	98.3	97.3	97.1	98.2	98.3	97.2	95.3	95.3	95.5
3 <i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	99.3	98.9	100	97.6	98.4	97.8	97.3	98.2	98.4	97.2	95.0	95.4	95.6
4 <i>Dactylosporangium fulvum</i>	97.3	97.1	97.6	100	97.8	99.6	97.9	97.6	97.8	96.8	94.6	94.7	95.0
5 <i>Dactylosporangium matsuzakiense</i>	98.1	98.3	98.4	97.8	100	98	97.4	99.6	98.8	96.2	94.7	94.8	94.9
6 <i>Dactylosporangium roseum</i>	97.6	97.3	97.8	99.6	98.0	100	98.0	97.8	97.9	96.8	94.7	94.9	95.2
7 <i>Dactylosporangium thailandense</i>	97.4	97.1	97.3	97.9	97.4	98	100	97.3	97.1	96.5	94.5	94.2	94.4
8 <i>Dactylosporangium vinaceum</i>	98.0	98.2	98.2	97.6	99.6	97.8	97.3	100	98.6	96.1	94.6	94.9	95.0
9 <i>Dactylosporangium salmonium</i>	98.2	98.3	98.4	97.8	98.8	97.9	97.1	98.6	100	96.7	94.6	95.0	95.3
10 <i>Polymorphospora rubbe</i>	97.4	97.2	97.2	96.8	96.2	96.8	96.5	96.1	96.7	100	96.5	96.1	96.2
11 <i>Pilimelia anulata</i>	95.2	95.3	95.0	94.6	94.7	94.7	94.5	94.6	94.6	96.5	100	94.5	94.6
12 <i>Catellatospora methionotrophica</i>	95.4	95.3	95.4	94.7	94.8	94.9	94.2	94.9	95.0	96.1	94.5	100	99.6
13 <i>Catellatospora chokoriensis</i>	95.6	95.5	95.6	95.0	94.9	95.2	94.4	95.0	95.3	96.2	94.6	99.6	100

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW5-25 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Catellatospora*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8
1 MW5-25	100	98.8	99.3	98.6	99.1	98.9	93.4	96.0
2 <i>Catellatospora methionotrophica</i>	98.8	100	98.8	98.6	99.0	99.5	93.6	96.0
3 <i>Catellatospora citrea</i>	99.3	98.8	100	98.9	99.6	99.2	93.5	96.2
4 <i>Catellatospora bangladeshensis</i>	98.6	98.6	98.9	100	99.0	98.9	94.0	96.0
5 <i>Catellatospora coxensis</i>	99.1	99.0	99.6	99.0	100	99.2	93.5	96.2
6 <i>Catellatospora chokoriensis</i>	98.9	99.5	99.2	98.9	99.2	100	93.8	96.1
7 <i>Catellatospora koreensis</i>	93.4	93.6	93.5	94.0	93.5	93.8	100	93.9
8 <i>Hamadaea tsunoensis</i>	96.0	96.0	96.2	96.0	96.2	96.1	93.9	100

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW3-11, MW5-16 และ MW7-20 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Streptosporangium*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 MW3-11	100	99.1	99.4	98.2	99.2	98.6	98.0	98.0	97.8	98.1	98.7	97.2
2 MW5-16	99.1	100	98.8	98.7	98.6	99.1	97.6	97.4	98.3	98.2	99.0	96.6
3 MW7-20	99.4	98.8	100	97.9	98.7	98.3	97.9	97.7	97.5	97.8	98.4	96.9
4 <i>Streptosporangium album</i>	98.2	98.7	97.9	100	97.7	99.3	96.7	96.8	97.9	97.2	99.4	95.7
5 <i>Streptosporangium amethystogenes</i>	99.2	98.6	98.7	97.7	100	98.1	98.5	97.3	97.3	98.3	98.2	96.5
6 <i>Streptosporangium canum</i>	98.6	99.1	98.3	99.3	98.1	100	97.3	96.9	98.5	97.8	99.8	96.1
7 <i>Streptosporangium longisporum</i>	98.0	97.6	97.9	96.7	98.5	97.3	100	96.3	96.7	97.3	97.2	95.5
8 <i>Streptosporangium purpuratum</i>	98.0	97.4	97.7	96.8	97.3	96.9	96.3	100	96.1	96.4	97.0	95.7
9 <i>Streptosporangium roseum</i>	97.8	98.3	97.5	97.9	97.3	98.5	96.7	96.1	100	97.0	98.4	95.5
10 <i>Streptosporangium subroseum</i>	98.1	98.2	97.8	97.2	98.3	97.8	97.3	96.4	97.0	100	97.7	95.6
11 <i>Streptosporangium vulgare</i>	98.7	99.0	98.4	99.4	98.2	99.8	97.2	97.0	98.4	97.7	100	96.2
12 <i>Streptosporangium yunnanense</i>	97.2	96.6	96.9	95.7	96.5	96.1	95.5	95.7	95.5	95.6	96.2	100

ค่าร้อยละระดับความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW3-17 และ MW7-23 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Planotetraspora*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 MW3-17	100	99.0	98.9	98.7	98.4	96.6	96.9	95.4	96.3	96.3	95.0
2 MW7-23	99.0	100	98.7	98.7	98.0	96.0	96.9	94.9	95.8	96.0	94.5
3 <i>Planotetraspora mira</i>	98.9	98.7	100	99.1	98.1	96.5	96.8	94.8	95.7	95.7	94.4
4 <i>Planotetraspora silvatica</i>	98.7	98.7	99.1	100	97.8	96.3	96.7	94.8	95.7	95.7	94.4
5 <i>Planotetraspora thailandica</i>	98.4	98.0	98.1	97.8	100	97.2	96.5	95.5	96.5	96.5	95.4
6 <i>Microbispora rosea subsp.rosea</i>	96.6	96.0	96.5	96.3	97.2	100	95.4	95.5	95.5	95.5	95.3
7 <i>Herbidospira cretacea</i>	96.9	96.9	96.8	96.7	96.5	95.4	100	95.4	95.8	95.8	95.2
8 <i>Microtetraspor fusca</i>	95.4	94.9	94.8	94.8	95.5	95.5	95.4	100	98.8	98.2	98.6
9 <i>Microtetraspora glauca</i>	96.3	95.8	95.7	95.7	96.5	95.5	95.8	98.8	100	98.9	98.3
10 <i>Microtetraspora malaysiensis</i>	96.3	96.0	95.7	95.7	96.5	95.5	95.8	98.2	98.9	100	97.5
11 <i>Microtetraspora niveoalba</i>	95.0	94.5	94.4	94.4	95.4	95.3	95.2	98.6	98.3	97.5	100

คำอธิบายระดับความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW10-11 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Herbidospora*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 MW10-11	100	98.5	96.5	97.0	96.6	96.3	96.9	96.8	96.6	95.5	95.4	95.2
2 <i>Herbidospora cretacea</i>	98.5	100	95.7	96.3	96.3	95.5	97.2	97.3	97.2	95.9	95.6	95.3
3 <i>Microtetraspora fusca</i>	96.5	95.7	100	99.2	98.5	98.6	95.1	95.3	96.1	95.7	95.3	94.8
4 <i>Microtetraspora glauca</i>	97.0	96.3	99.2	100	98.9	98.6	95.7	95.9	96.6	95.3	96.1	95.2
5 <i>Microtetraspora malaysiensis</i>	96.6	96.3	98.5	98.9	100	97.7	95.7	95.9	96.6	95.3	95.7	95.6
6 <i>Microtetraspora niveoalba</i>	96.3	95.5	98.6	98.6	97.7	100	94.7	94.9	95.9	95.5	95.3	94.6
7 <i>Planotetraspora mira</i>	96.9	97.2	95.1	95.7	95.7	94.7	100	99.1	98.4	96.5	96.6	96.4
8 <i>Planotetraspora silvatica</i>	96.8	97.3	95.3	95.9	95.9	94.9	99.1	100	98.3	96.5	96.6	96.6
9 <i>Planotetraspora thailandica</i>	96.6	97.2	96.1	96.6	96.6	95.9	98.4	98.3	100	97.4	97.3	97.1
10 <i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>aerata</i>	95.5	95.9	95.7	95.3	95.3	95.5	96.5	96.5	97.4	100	97.8	97.2
11 <i>Microbispora corallina</i>	95.4	95.6	95.3	96.1	95.7	95.3	96.6	96.6	97.3	97.8	100	97.1
12 <i>Microbispora rosea</i>	95.2	95.3	94.8	95.2	95.6	94.6	96.4	96.6	97.1	97.2	97.1	100

คำอธิบายระดับความคล้ายคลึงของไอโซเลต MW12-18 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Nocardia*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 MW12-18	100	95.4	97.4	97.7	97.3	96.6	98.3	98.0	97.6	96.5	96.1	96.5	97.7	97.5
2 <i>Nocardia amamiensis</i>	95.4	100	97.8	97.4	97.5	95.9	96.2	95.9	96.6	96.5	98.6	95.5	96.3	96.6
3 <i>Nocardia araoensis</i>	97.4	97.8	100	99.4	99.4	97.8	98.2	97.9	97.5	97.8	98.0	96.4	97.8	98.0
4 <i>Nocardia arthritidis</i>	97.7	97.4	99.4	100	99.1	97.6	98.7	98.4	97.4	97.5	97.7	96.3	97.6	97.9
5 <i>Nocardia beijingsis</i>	97.3	97.5	99.4	99.1	100	98.1	98.1	98.0	97.4	97.9	98.1	96.3	97.4	97.8
6 <i>Nocardia brevicatena</i>	96.6	95.9	97.8	97.6	98.1	100	97.4	97.3	96.6	99.3	96.5	95.5	96.9	97.0
7 <i>Nocardia exalbida</i>	98.3	96.2	98.2	98.7	98.1	97.4	100	99.0	98.0	97.3	96.5	96.9	98.1	98.1
8 <i>Nocardia gamkensis</i>	98.0	95.9	97.9	98.4	98.0	97.3	99.0	100	97.7	97.0	96.4	96.6	97.8	97.8
9 <i>Nocardia lijiangensis</i>	97.6	96.6	97.5	97.4	97.4	96.6	98.0	97.7	100	97.2	96.1	98.8	98.9	99.1
10 <i>Nocardia paucivorans</i>	96.5	96.5	97.8	97.5	97.9	99.3	97.3	97.0	97.2	100	96.4	96.1	97.1	97.2
11 <i>Nocardia pneumoniae</i>	96.1	98.6	98.0	97.7	98.1	96.5	96.5	96.4	96.1	96.4	100	95.0	96.2	96.4
12 <i>Nocardia polyresistens</i>	96.5	95.5	96.4	96.3	96.3	95.5	96.9	96.6	98.8	96.1	95.0	100	97.8	98.0
13 <i>Nocardia takedensis</i>	97.7	96.3	97.8	97.6	97.4	96.9	98.1	97.8	98.9	97.1	96.2	97.8	100	98.3
14 <i>Nocardia xishanensis</i>	97.5	96.6	98.0	97.9	97.8	97.0	98.1	97.8	99.1	97.2	96.4	98.0	98.3	100

คำร้อยละระดับความคล้ายคลึงของ ไอ โชนิต MW1-15 และ MW2-22 เทียบกับสมาชิกของเชื้อในสกุล *Nonomuraea*

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 MW1-15	100	99.1	98.4	98.8	98.4	99.1	98.8	98.8	97.9	97.7	100	98.4
2 MW2-22	99.1	100	98.4	98.8	98.4	98.2	98.8	98.8	97.7	97.3	99.1	97.9
3 <i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	98.4	98.4	100	99.5	100	97.5	99.0	99.0	96.8	97.0	98.4	99.0
4 <i>Nonomuraea candida</i>	98.8	98.8	99.5	100	99.5	97.9	99.0	99.0	97.3	97.5	98.8	98.6
5 <i>Nonomuraea coxensis</i>	98.4	98.4	100	99.5	100	97.5	99.0	99.0	96.8	97.0	98.4	99.0
6 <i>Nonomuraea dietziae</i>	99.1	98.2	97.5	97.9	97.5	100	97.9	97.9	97.5	96.8	99.1	97.5
7 <i>Nonomuraea kuesteri</i>	98.8	98.8	99.0	99.0	99.0	97.9	100	100	97.3	97.0	98.8	98.6
8 <i>Nonomuraea maheshkhaliensis</i>	98.8	98.8	99.0	99.0	99.0	97.9	100	100	97.3	97.0	98.8	98.6
9 <i>Nonomuraea recticatena</i>	97.9	97.7	96.8	97.3	96.8	97.5	97.3	97.3	100	96.1	97.9	96.8
10 <i>Nonomuraea rubra</i>	97.7	97.3	97.0	97.5	97.0	96.8	97.0	97.0	96.1	100	97.7	97.0
11 <i>Nonomuraea spiralis</i>	100	99.1	98.4	98.8	98.4	99.1	98.8	98.8	97.9	97.7	100	98.4
12 <i>Nonomuraea turkmeniaca</i>	98.4	97.9	99.0	98.6	99	97.5	98.6	98.6	96.8	97.0	98.4	100

ภาคผนวก ๓

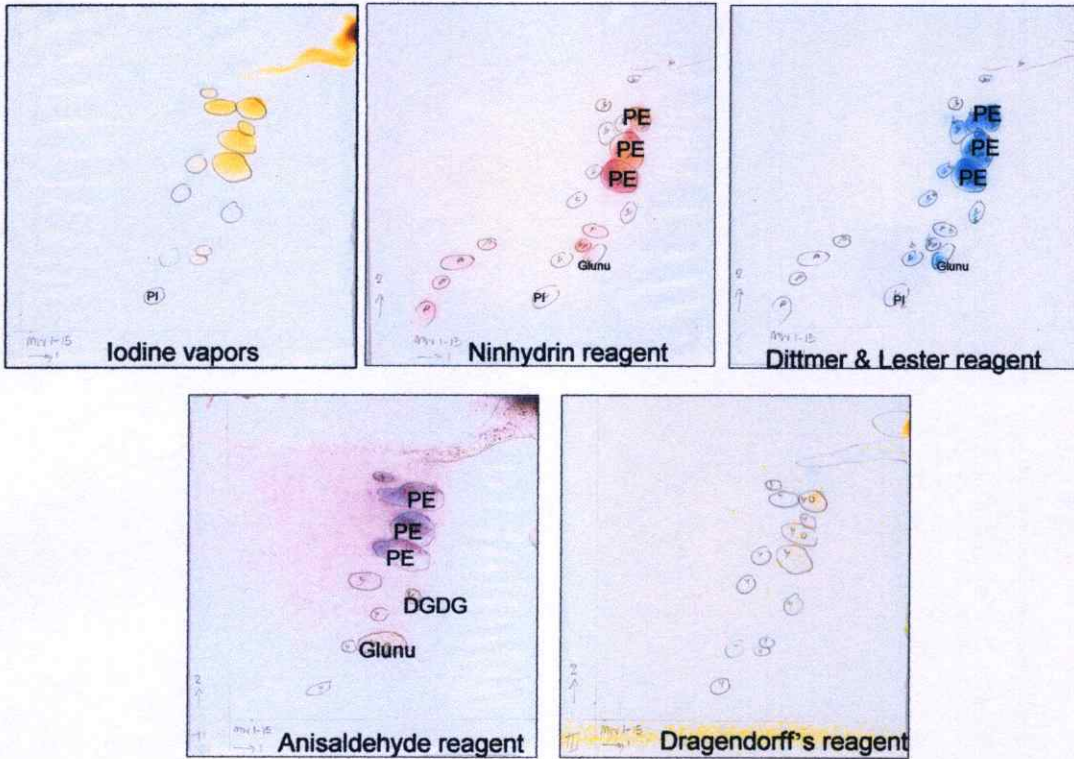
เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่แยกได้จากชนิดของตัวอย่างดิน วิธีคัดเลือก และสูตรอาหารต่างๆ

สกุล	ตัวอย่าง	วิธีคัดเลือก	สูตรอาหาร
<i>Catellatospora</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar
<i>Dactylosporangium</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส, การต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar, Soil extract medium
<i>Herbidospora</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar, Soil extract medium
<i>Kribbella</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	Humic acid vitamin agar
<i>Micromonospora</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส, การใช้สารละลายฟีนอล	AV-medium, Humic acid vitamin agar
<i>Nonomuraea</i>	ดิน	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar, Soil extract medium
<i>Nocardia</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	Humic acid vitamin agar, Soil extract medium
<i>Planotetraspora</i>	ดิน	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส, การต้มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar
<i>Pseudonocardia</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง	Humic acid vitamin agar
<i>Streptosporangium</i>	ดิน, ซากอินทรีย์สาร	การฝังตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, การอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส	Humic acid vitamin agar, Soil extract medium

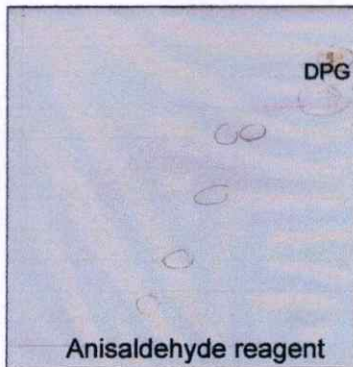
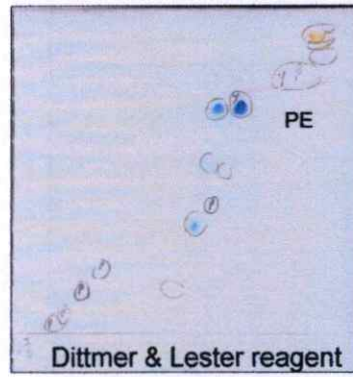
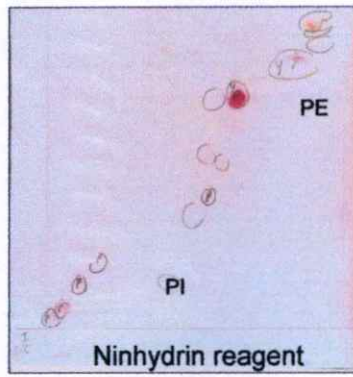
ภาคผนวก ข

รูปผลการวิเคราะห์ Polar lipid บนแผ่น silica TLC

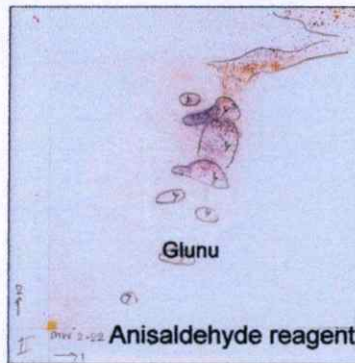
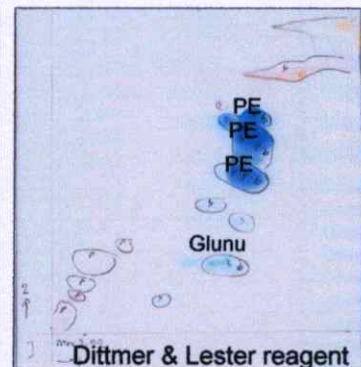
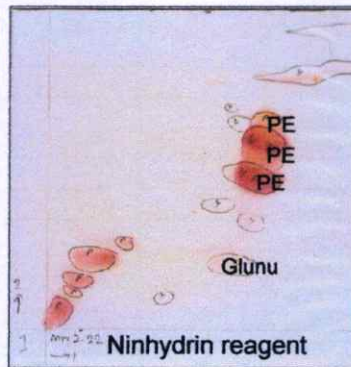
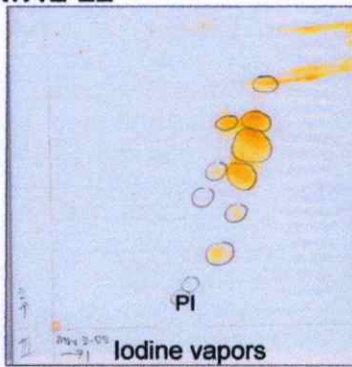
MW1-15



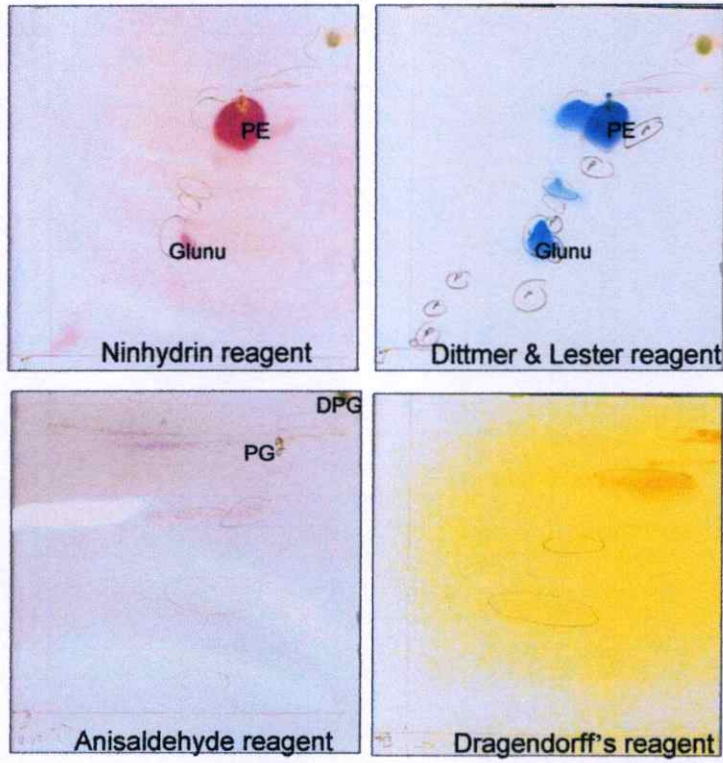
MW2-5



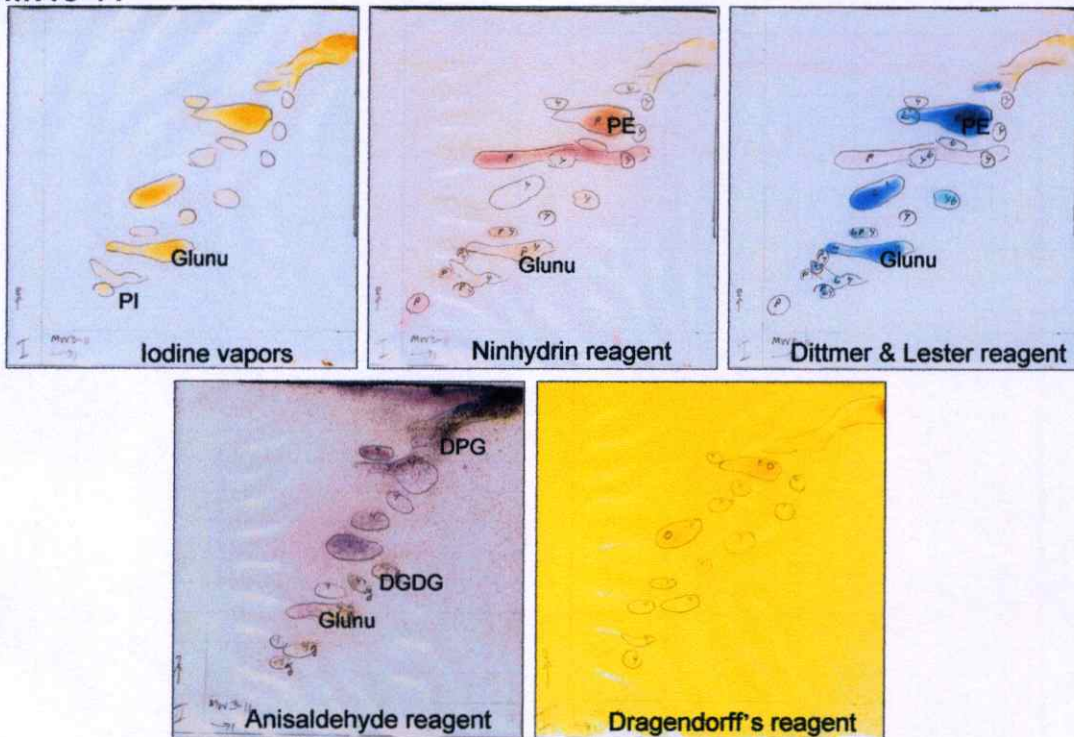
MW2-22



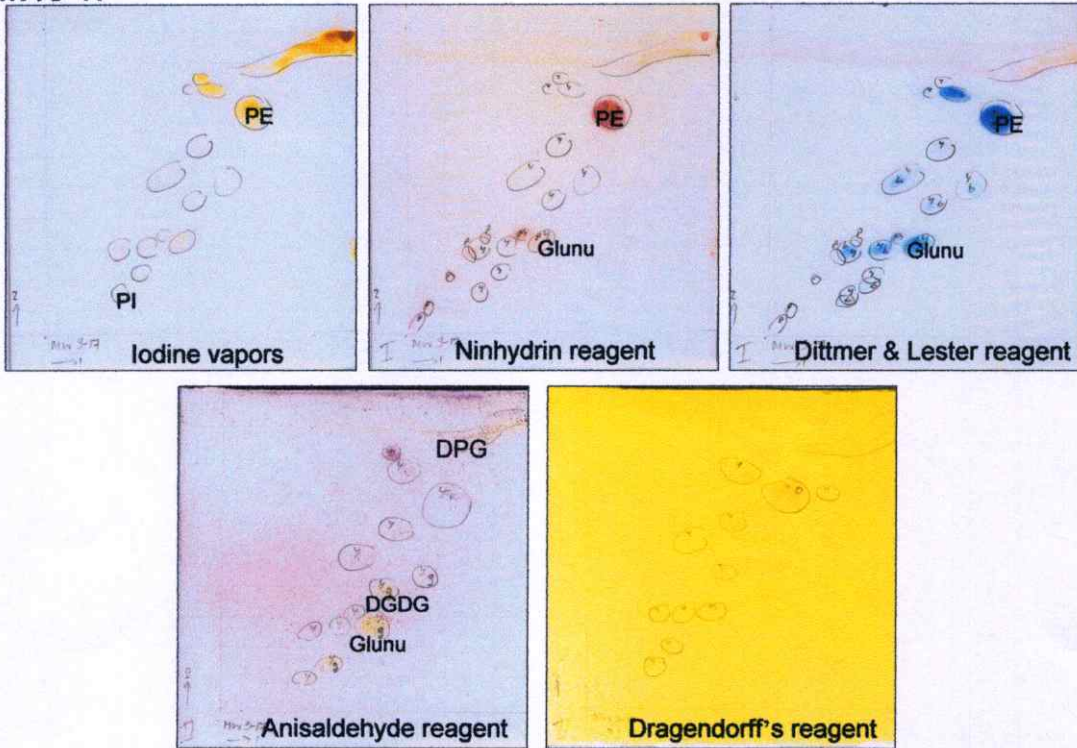
MW2-25



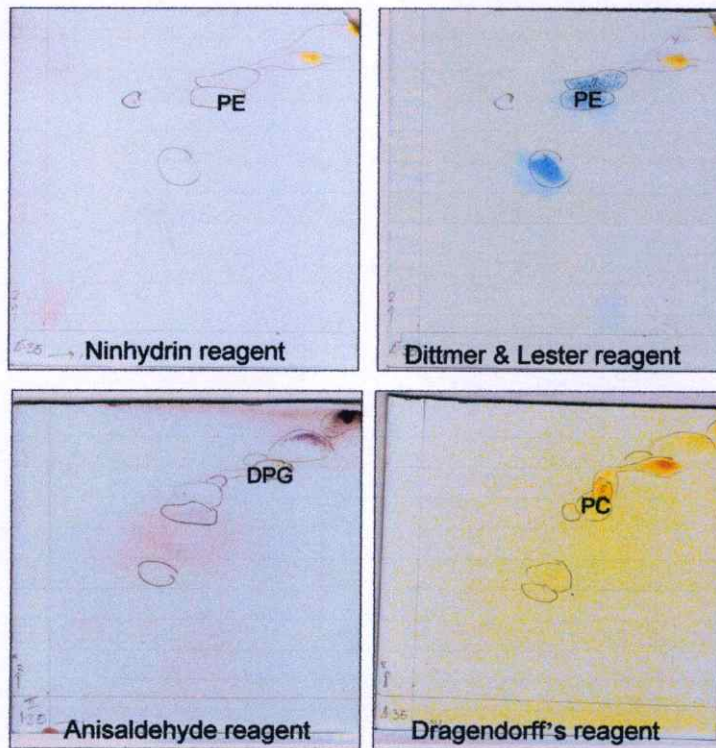
MW3-11



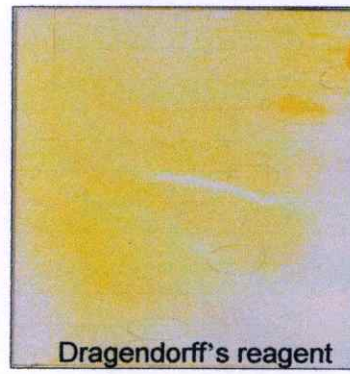
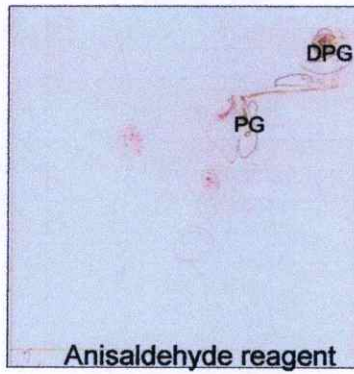
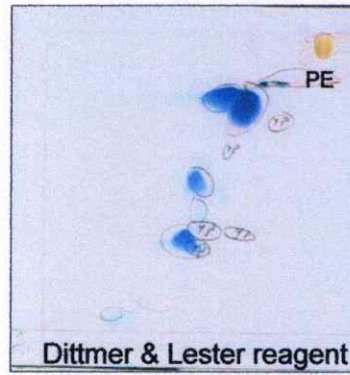
MW3-17



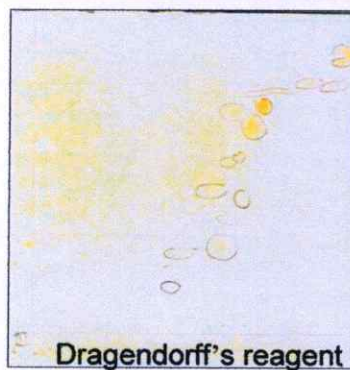
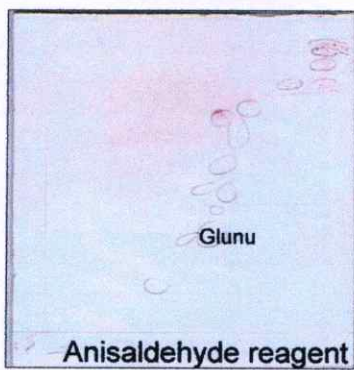
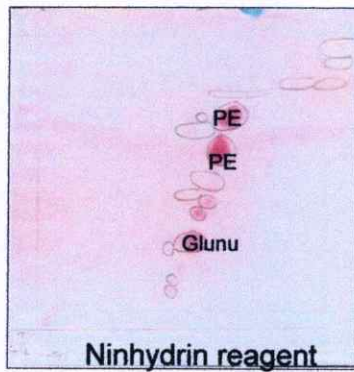
MW4-35



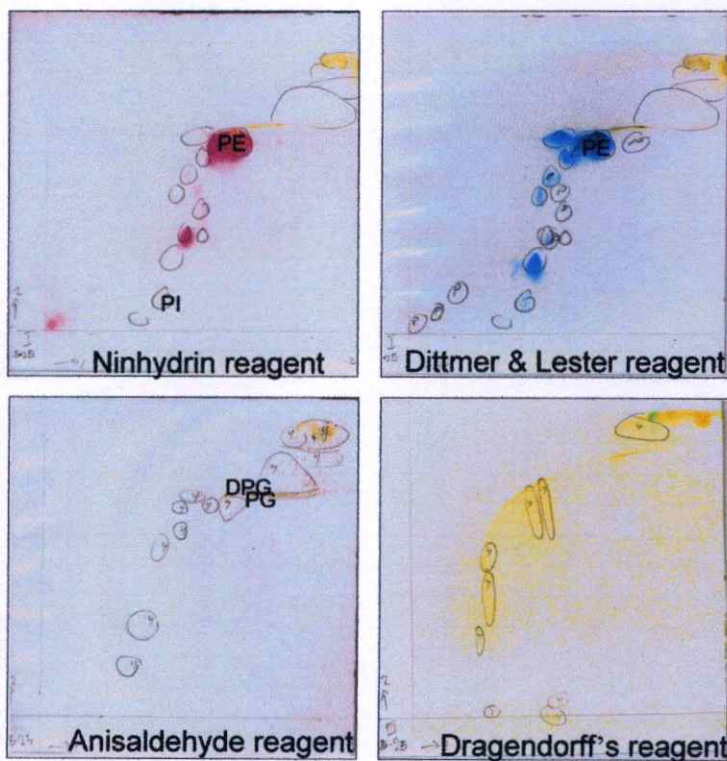
MW4-36



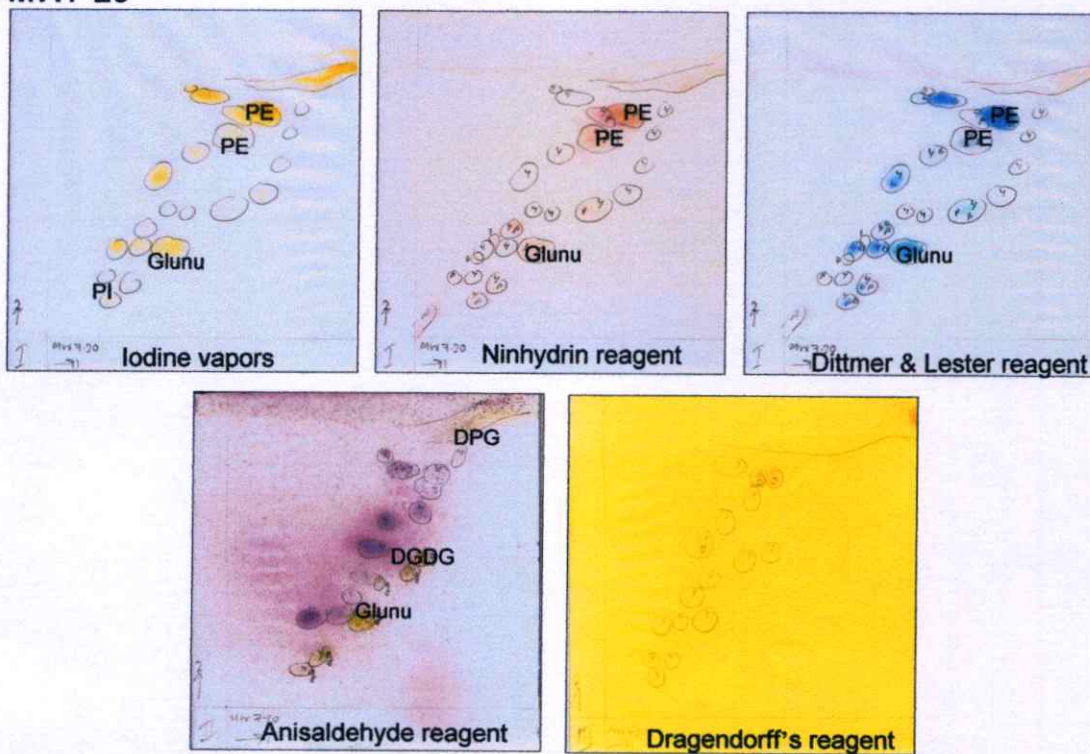
MW5-16



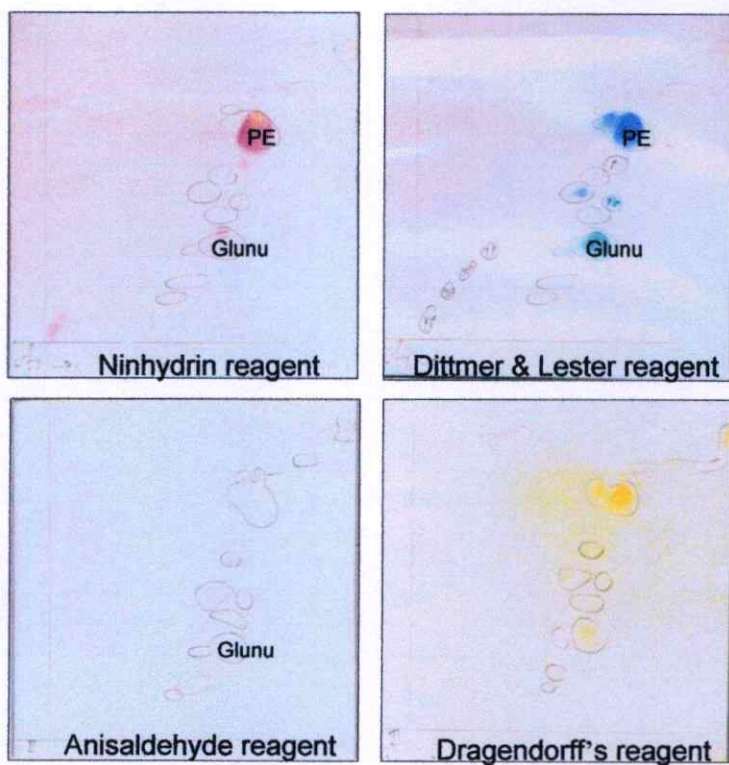
MW5-25



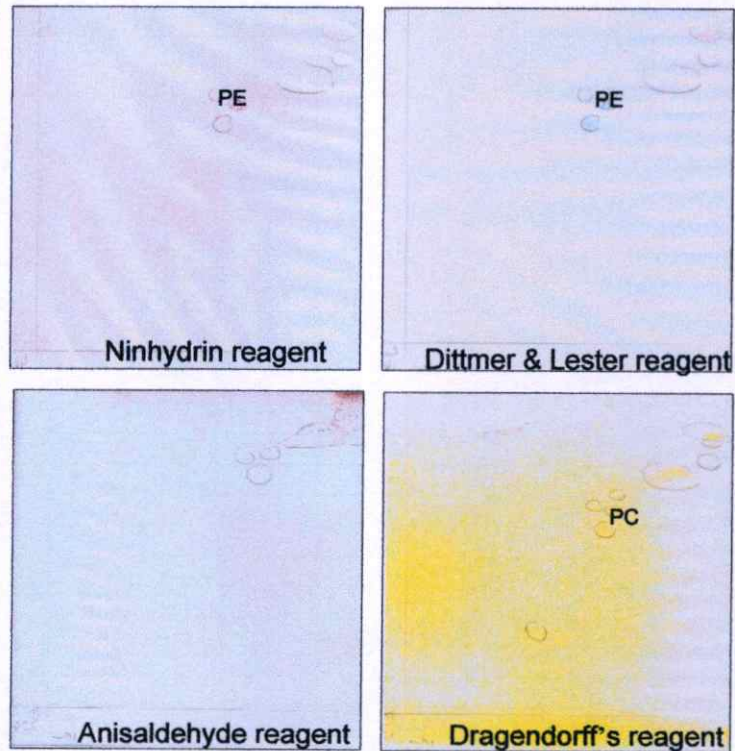
MW7-20



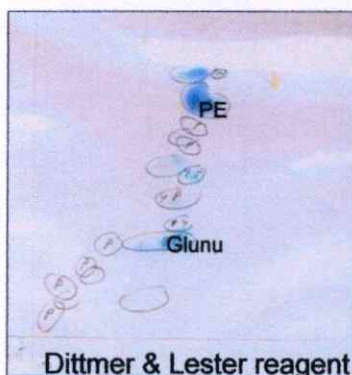
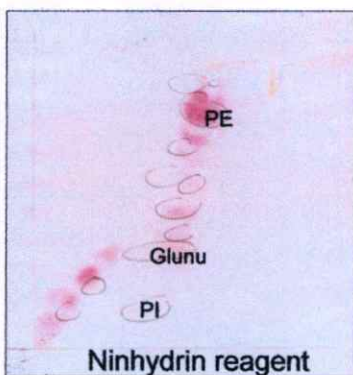
MW7-23



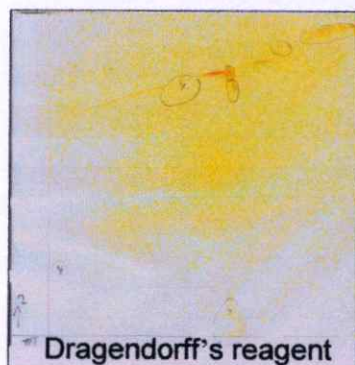
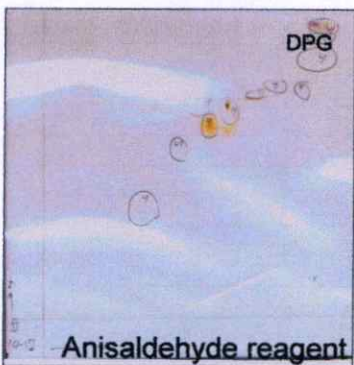
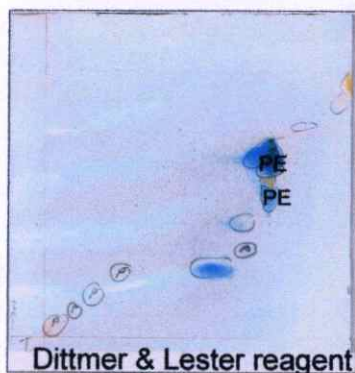
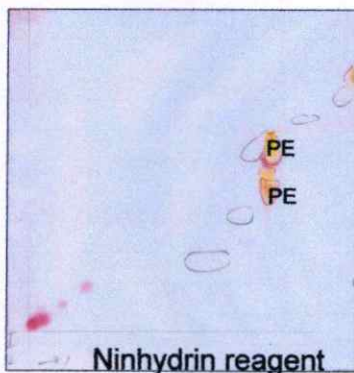
MW8-21



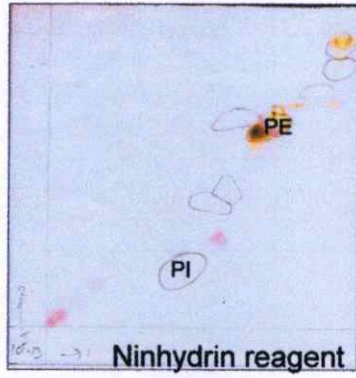
MW10-11



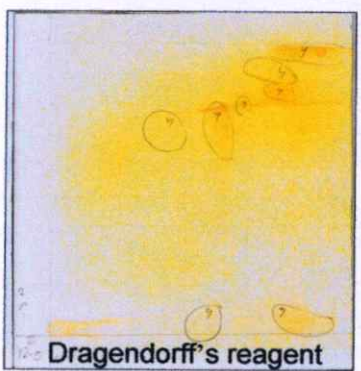
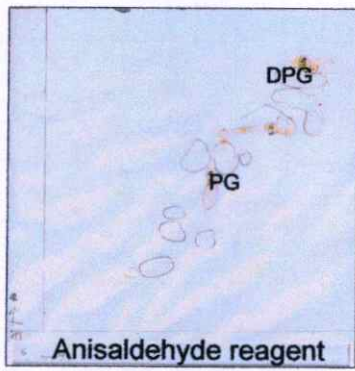
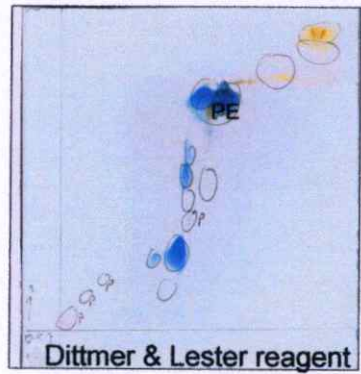
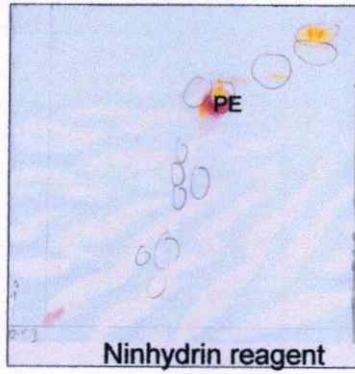
MW10-12



MW10-13



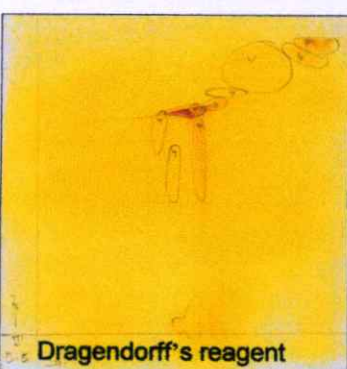
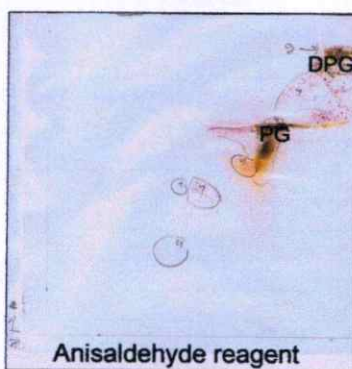
MW12-5



MW12-18



MW13-5



ภาคผนวก ข

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตและ  
 บิวทานอลจากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด และสารละลายเคอร์เซทินโดยมี  
 เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความยาวคลื่น  
 517 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ระดับ ความ เข้มข้น	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	%DPPH reduction
ชุดควบคุมเชิงลบ		0.904	0.907	0.912	0.907	0
ชุดควบคุมเชิงบวก	$5 \times 10^{-2}$	0.148	0.148	0.159	0.151	83.3
	$5 \times 10^{-3}$	0.162	0.154	0.176	0.164	81.9
	$5 \times 10^{-4}$	0.376	0.37	0.367	0.371	59
	$5 \times 10^{-5}$	0.665	0.666	0.666	0.665	26.6
	$5 \times 10^{-6}$	0.788	0.757	0.803	0.792	12.6
	$5 \times 10^{-7}$	0.826	0.835	0.835	0.832	8.2
	$5 \times 10^{-8}$	0.889	0.888	0.891	0.889	1.9
	$5 \times 10^{-9}$	0.903	0.918	0.925	0.915	0.8
	$5 \times 10^{-10}$	0.941	0.94	0.956	0.945	-0.41
MW3-11 (เอทิลอะซีเตต)	$5 \times 10^{-2}$	0.232	0.234	0.231	0.232	74.4
	$5 \times 10^{-3}$	0.389	0.384	0.385	0.386	57.4
	$5 \times 10^{-4}$	0.647	0.642	0.652	0.672	25.9
	$5 \times 10^{-5}$	0.719	0.722	0.729	0.723	20.2
	$5 \times 10^{-6}$	0.821	0.82	0.819	0.82	9.5
	$5 \times 10^{-7}$	0.83	0.792	0.794	0.805	11.2
	$5 \times 10^{-8}$	0.82	0.826	0.82	0.822	9.3
	$5 \times 10^{-9}$	0.794	0.836	0.843	0.816	10
	$5 \times 10^{-10}$	0.855	0.849	0.85	0.851	6.1

ตัวอย่าง	ระดับ ความ เข้มข้น	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	%DPPH reduction
MW3-11 (เอ็น-บิวทานอล)	$5 \times 10^{-2}$	0.158	0.156	0.157	0.157	82.6
	$5 \times 10^{-3}$	0.506	0.505	0.5	0.503	44.5
	$5 \times 10^{-4}$	0.737	0.735	0.736	0.736	18.8
	$5 \times 10^{-5}$	0.826	0.812	0.83	0.822	9.3
	$5 \times 10^{-6}$	0.831	0.826	0.835	0.83	8.4
	$5 \times 10^{-7}$	0.857	0.847	0.849	0.851	6.1
	$5 \times 10^{-8}$	0.847	0.844	0.848	0.846	6.7
	$5 \times 10^{-9}$	0.833	0.874	0.88	0.879	3
	$5 \times 10^{-10}$	0.93	0.903	0.888	0.907	0
MW3-17 (เอทิลอะซิเตต)	$5 \times 10^{-2}$	0.136	0.136	0.135	0.135	85.1
	$5 \times 10^{-3}$	0.428	0.43	0.429	0.429	52.7
	$5 \times 10^{-4}$	0.64	0.642	0.641	0.641	29.3
	$5 \times 10^{-5}$	0.76	0.761	0.761	0.76	16.2
	$5 \times 10^{-6}$	0.781	0.799	0.808	0.796	12.2
	$5 \times 10^{-7}$	0.798	0.796	0.793	0.755	16.7
	$5 \times 10^{-8}$	0.773	0.857	0.865	0.831	8.3
	$5 \times 10^{-9}$	0.812	0.81	0.819	0.813	10.3
	$5 \times 10^{-10}$	0.86	0.875	0.867	0.867	4.4
MW3-17 (เอ็น-บิวทานอล)	$5 \times 10^{-2}$	0.103	0.102	0.101	0.102	88.7
	$5 \times 10^{-3}$	0.522	0.52	0.52	0.52	42.6
	$5 \times 10^{-4}$	0.668	0.666	0.668	0.667	26.4
	$5 \times 10^{-5}$	0.753	0.746	0.757	0.752	17
	$5 \times 10^{-6}$	0.748	0.747	0.742	0.745	17.8
	$5 \times 10^{-7}$	0.74	0.748	0.746	0.744	17.9
	$5 \times 10^{-8}$	0.723	0.727	0.736	0.728	19.7
	$5 \times 10^{-9}$	0.859	0.855	0.863	0.859	5.2
	$5 \times 10^{-10}$	0.792	0.802	0.807	0.8	11.7

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล                      นางสาวสุทามาส เจียรพงษ์พร  
วัน เดือน ปีเกิด                25 สิงหาคม 2524  
ที่อยู่                                192/19 หมู่4 ซอย9 ตำบลบางริน อำเภอมือง จังหวัดระนอง 85000  
ประวัติการศึกษา                2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน  
    ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
    สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
  
ประวัติการทำงาน                2548 เจ้าหน้าที่โครงการเรียนรู้ร่วมกันสรรค์สร้างชุมชน  
    วิทยาลัยการจัดการทางสังคม

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์    Chiaraphongphon, S. Suriyachadkun, C. Tamura, T. and Thawai, C. 2009.  
    “*Dactylosporangium maewongense* sp. nov., isolated from a Thai  
    soil”. **International Journal of Systematic and Evolutionary  
    Microbiology**. (Accepted, Impact Factor 2.22)  
  
    Chiaraphongphon, S. Suriyachadkun, C. Tamura, T. and Thawai, C.  
    “*Dactylosporangium tropicalis* sp. nov., isolated from a Thai soil”.  
    **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.  
    (Submitted)  
  
    Chiaraphongphon, S. Suriyachadkun, C and Thawai, C. 2007.  
    Distribution of terrestrial actinomycetes in Mae-Wong National  
    Park, Thailand. The 5th International Symposium on Biocontrol and  
    Biotechnology. Thailand. (Poster presentation)