

การระบุชนิดของแอกติโนมัยซีทที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATES FROM
THAI-MEDECINAL PLANTS



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การระบุชนิดของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATES FROM
THAI-MEDECINAL PLANTS



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATES FROM THAI-MEDECINAL PLANTS



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การระบุชนิดของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเคียงเดือน พลครบุรี รหัสนักศึกษา 56050964 นางสาวศรสวรรค์ ชนะโกศลจิต รหัสนักศึกษา 56051074 นางสาวอิสริญา มะวา รหัสนักศึกษา 56051107
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.จิตติ ท่าไ้

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย ประธานกรรมการ	 
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	 
รศ.ดร.จิตติ ท่าไ้ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	 

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การระบุชนิดของแอกติโนมัยสีทที่แยกจากพืชสมุนไพรไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเคียงเดือน พลครบุรี รหัสนักศึกษา 56050964 นางสาวศรสวรรค์ ชนะโกศลจิต รหัสนักศึกษา 56051074 นางสาวอิสริญา มะวา รหัสนักศึกษา 56051107
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.จิตติ ท่าไวย

บทคัดย่อ

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-29 CP1-1 และ KK1-2 ถูกแยกจากรากของต้นกะลา ใบของต้นกระเจียวขาว และใบของต้นเปราะราสี ตามลำดับ เชื้อเหล่านี้ถูกนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธานด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าแอกติโนมัยสีทเหล่านี้เป็นสมาชิกของแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces Jishengella* และ *Micromonospora* ตามลำดับ โดยไอโซเลต AN1-29 แสดงชนิดของกรดไดอะมิโนพิมิลิกแบบแอลแอลในผนังเซลล์ มีน้ำตาลในเซลล์ประกอบไปด้วย ไรโบส อะลาบิโนส และ กาแลคโตส มีฟอสโฟลิปิดชนิดไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน เชื้อไอโซเลตนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces glebusus* CGMCC 4.1873 มากที่สุด ที่ระดับค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง 16S rRNA gene เท่ากับร้อยละ 98.40 ไอโซเลต CP1-1 แสดงชนิดของกรดไดอะมิโนพิมิลิกแบบมีโซ น้ำตาลในเซลล์ประกอบไปด้วยกลูโคส ไรโบส อะลาบิโนส มีฟอสโฟลิปิดชนิดไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล และ ฟอสฟาติดีลไอโนซิทอล ในเยื่อหุ้มเซลล์ เชื้อไอโซเลตนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Jishengella endophytica* 202201^T มากที่สุด ที่ระดับค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง 16S rRNA gene เท่ากับร้อยละ 99.22 และไอโซเลต KK1-2 แสดงชนิดของกรดไดอะมิโนพิมิลิกแบบมีโซ น้ำตาลในเซลล์ประกอบไปด้วยกลูโคส ไรโบส ซาโลส และ อะลาบิโนส มีฟอสโฟลิปิดชนิดไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล ฟอสฟาติดีลไอโนซิทอลแมนโนไซด์ และ ฟอสฟาติดีลไอโนซิทอล เชื้อไอโซเลตนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora rhizosphaerae* 211018^T มากที่สุด ที่ระดับค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง 16S rRNA gene เท่ากับร้อยละ 98.96 จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า เชื้อทั้งสามไอโซเลตมีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Streptomyces Jishengella* และ *Micromonospora*

คำสำคัญ : พืชสมุนไพรไทย ลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification of actinomycetes Isolated from Thai-medecinal plants
Students	Miss Khingduen Ponconbury Student ID 56050964 Miss Sornsawan Chanakosoljit Student ID 56051074 Miss Issareeya Mawa Student ID 56051107
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Assoc.Prof.Dr.Chitti Thawai

Abstract

Three isolates of endophytic actinomycetes, AN1-29 CP1-1 and KK1-2 were isolated from the roots of *Alpinia nigra*, a leaf of *Curcuma parriflora* and a leaf of *Kaempferia larsenii*, respectively. All isolates were taxonomically determined using a procedure with the combination of phenotype, chemotype and the 16S rRNA gene sequence analyses. The results showed that these isolates were classified into 3 genera, *Streptomyces*, *Jishengella* and *Micromonospora*, respectively. Isolate AN1-29 exhibits LL-diaminopimelic acid in cell wall. This isolate contains ribose, arabinose and galactose in cell and comprises diphosphatidylglycerol (DPG) and phosphatidylethanolamine (PE) in cell membrane. This isolate is closely related to *Streptomyces glebusus* CGMCC 4.1873^T with the 16S rRNA gene sequence similarity value of 98.40%. Isolate CP1-1 contains meso-diaminopimelic acid in cell wall. This isolate contains glucose, ribose and arabinose in cell and comprises diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG) and Phosphatidylinositol (PI) in cell membrane. This isolate is closely related to *Jishengella endophytica* 202201^T with the 16S rRNA gene sequence similarity value of 99.22%. Isolate KK1-2 has meso-diaminopimelic acid in cell wall. This isolate contains glucose, ribose, xylose and arabinose in cell and comprises diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG) Phosphatidylinositolmannosides (PIMs) and Phosphatidylinositol (PI) in cell membrane. This isolate is closely related to *Micromonospora rhizosphaerae* 211018^T with the 16S rRNA gene sequence similarity value of 98.96%. This study could be concluded that these three isolates should be judged as the novel species of the genera *Streptomyces*, *Jishengella* and *Micromonospora*, respectively.

Keywords : Thai-medecinal plants, Phenotype, Chemotype, Genotype

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

หัวข้อปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติ ท่าไว อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นที่ยังในการให้คำปรึกษาระหว่างการดำเนินงาน ค้นคว้า และวิจัย รวมทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย ประธานกรรมการ และ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ อาจารย์ประจำภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นที่ยังในการให้คำปรึกษาและให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัย และสละเวลาในการเข้าร่วมการสอบปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการประจำภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่งานบัณฑิตศึกษา และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคาร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ จนปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งผู้ที่มีส่วนร่วมในปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมาจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เคียงเดือน	พลกรบุรี
ศรสวรรค์	ชนะโกศลจิต
อิสรีญา	มะวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แอคติโนไมซีท(Actinomycetes).....	3
2.1.1 สันฐานวิทยาของแอกติโนไมซีท.....	4
2.1.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนไมซีท.....	9
2.1.3 การจัดจำแนกแอกติโนไมซีท.....	9
2.1.4 แหล่งของแอกติโนไมซีท.....	14
2.1.5 การตัดแยกแอกติโนไมซีท.....	16
2.1.6 ประโยชน์ของแอกติโนไมซีท.....	18
2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย.....	19
2.3 งานวิจัยที่สนับสนุนและเกี่ยวข้อง.....	30
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	66
เอกสารอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก ก สูตรอาหารต่างๆ.....	72
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	82
ภาคผนวก ค การเตรียม Buffer ทดสอบการเจริญที่ pH ต่างๆ.....	89
ภาคผนวก ง The NBS/IBCC Color System.....	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีท	9
2.2 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยสีท	9
2.3 ลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสีททั้ง 7 กลุ่ม	13
2.4 การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยสีทใน order Actinomycetales	13
2.5 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท	24
2.6 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมากในเชื้อแอกติโนมัยสีท	25
2.7 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทแบบ <i>maso</i> -DAP	25
2.8 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย	27
2.9 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอกติโนมัยสีท	28
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่	42
3.2 วงจรพีซีอาร์	43
3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene	44
3.4 โปรแกรม BIG dye	44
4.1 แสดงรายละเอียดของพืชตัวอย่างและรหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้	46
4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหารชนิดต่างๆ	56
4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท	57
4.4 การใช้แหล่งพลังงานของเชื้อแอกติโนมัยสีท	59
4.5 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อแอกติโนมัยสีท	61
4.6 ผลการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของ DAP ที่ผนังเซลล์เชื้อแอกติโนมัยสีท	62
4.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท	62
4.8 แสดงองค์ประกอบของไขมันชนิดมีขั้วของเชื้อแอกติโนมัยสีท	63
4.9 ชนิดของ MK ที่พบในเชื้อแอกติโนมัยสีท	64
4.10 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีท	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท.....	4
2.2 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยแบคทีเรียบนอาหารแข็ง.....	4
2.3 การสร้างสปอร์เดี่ยว.....	6
2.4 ลักษณะสปอร์เป็นสาย.....	6
2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร.....	8
2.6 โครงสร้างของแบปทีโดไกลแคน.....	23
2.7 โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย.....	28
2.8 โครงสร้างของกรดมัยคอลลิก.....	29
4.1 รูปไอโซเลต AN1-29.....	48
4.2 Phylogenetic tree AN1-29.....	49
4.3 รูปไอโซเลต CP1-1.....	50
4.4 Phylogenetic tree CP1-1.....	52
4.5 รูปไอโซเลต KK1-2.....	53
4.6 Phylogenetic tree KK1-2.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
Phenotype	ลักษณะทางฟีโนไทป์ ที่ปรากฏออกมาเนื่องจากการแสดงออกของยีนและอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม
Chemotype	ลักษณะทางเคมีไทป์ที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดของเซลล์ที่แสดงออกมาให้เห็นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือเกิดปฏิกิริยาเคมี
Genotype	ลักษณะทางจีโนไทป์ที่เป็นแบบของยีนที่ควบคุมลักษณะทั้งหมดของเชื้อ
DAP	Diaminopimelic acid
HPLC	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
GenBank	ธนาคารยีน เป็นธนาคารที่มีฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โปรตีน และอื่นๆ ทางด้านชีวโมเลกุล ซึ่งใช้สำหรับนักวิจัยเพื่อสืบค้นข้อมูลบนเว็บไซต์ คือ www.ncbi.nlm.nih.gov
MLSA	Multilocus Sequence Analysis ช่วยในการจัดลำดับอนุกรมวิธาน และยังสามารถนำมาใช้สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา และในการตรวจสอบรูปแบบของชีวภูมิศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อาศัยอยู่ในทะเล
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool เป็นโปรแกรมที่ทำหน้าที่ในการค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่างของ sequence ที่เราต้องการ
BioEdit	เป็นโปรแกรมที่ใช้งานโดยไม่ต้องผ่านอินเทอร์เน็ต ใช้หาเช่น หา Restriction Enzyme Reverse Complementary Alignment และ Conserve ได้
rRNA	Ribosomal RNA : RNA ชนิดหนึ่งที่มีไรโบโซมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ
PCR	Polymerase Chain Reaction ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA or gene) ที่สนใจอย่างจำเพาะเจาะจงได้ในปริมาณหลายล้านเท่าภายในหลอดทดลอง โดยใช้ระยะเวลาอย่างรวดเร็ว
D-/L- of Sugar	ของน้ำตาลตัวนั้นๆ บ่งบอกถึงความแตกต่างของโครงสร้าง ทำให้คุณสมบัติของน้ำตาลในการทำหน้าที่ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างมากมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนมัยสีทพบอยู่ในดินเป็นจำนวนมาก ประมาณ 10 เพอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน (Janssen, 2006) แอกติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่เป็น แซโพรไฟต์ (saprophyte) ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบจำพวกพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน ไคติน สามารถพบแอกติโนมัยสีทในดินที่มีอิวมัสและแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นจำนวนมากถึง 10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Goodfellow and Williams, 1983) ในขณะที่ดินที่มีน้ำขัง ไม่มีออกซิเจนและดินที่เป็นกรดจะพบแอกติโนมัยสีทในจำนวนที่น้อยกว่า คือ $10^2 - 10^3$ เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Williams and Wellington, 1982) โดยแอกติโนมัยสีทได้มีผู้สนใจศึกษาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีประโยชน์ โดยเฉพาะในการควบคุมโรคพืชต่างๆได้ในอนาคต และแอกติโนมัยสีท เป็นตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการแพทย์และยา เกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมถึงต่อวัฏจักรของระบบนิเวศ

ซึ่งอย่างในประเทศไทยพบพืชสมุนไพรไทยหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารต่อต้านหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น กะลา หรือ ข่าน้ำ ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Alpinia nigra* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นของชาวเกาะเกร็ด เป็นสมุนไพรที่มากสรรพคุณ ไม่ว่าจะนำไปปรุงอาหารได้หลากหลายเมนู และยังสามารถต้านโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดอุดตัน คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสียหรือถ่ายท้องรุนแรง ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับลมในท้อง โรคพยาธิใบไม้ โรคที่มากับน้ำ อย่างน้ำกัดเท้า และต้านเชื้อราบนผิวหนังได้หลายชนิด (@FoodandHealthforyou, 2015 และ หมอชาวบ้าน, 2552)

กระเจียวขาว ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma pariflora* จัดเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 15-50 เซนติเมตร และอาจสูงได้ถึง 70 เซนติเมตร มีเหง้าอยู่ใต้ดิน ลักษณะเป็นรูปไข่ และมีกลิ่นหอม ภายในเป็นสีน้ำตาลอ่อน ๆ ขนาดสั้นมาก เหง้าของลำต้นเทียมที่แก่เต็มที่หรือมีดอกแล้วเท่านั้นที่จะบวมพองสะสมน้ำและอาหารได้ ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้หัวเหง้าและเมล็ด เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงและมีแสงแดด ซึ่งในประเทศไทยสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ ตามป่าดิบทั่วไป ป่าดิบแล้ง ป่าผลัดใบ บริเวณโคกและบริเวณป่าโปร่ง ส่วนในต่างประเทศจะพบได้ที่ประเทศอินเดีย พม่า ลาว เวียดนาม มาเลเซีย และจีน สรรพคุณโดยทั่วไป ชาวบ้านในชนบทใช้ช่อดอกอ่อนรับประทานเป็นผัก เหง้าขับลม รักษาไข้ มีดอกสวยงาม นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2014)

เปราะราสี หรือ เปราะกระเจียว ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Kaempferia larsenii* พบในป่าไทยหลายชนิด ขึ้นกระจายพันธุ์ทั่วประเทศ พบว่ามีอยู่ประมาณ 17 ชนิด (วงศ์เดียวกับพวกขิง ข่า กระเทียมและไพล แต่อยู่ต่างสกุลกัน) เป็นพืชล้มลุก อายุปีเดียว พบเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบเป็นใบเดี่ยว แผ่ราบไปตามพื้นดินหรือเหนือผิวดิน มีรูปร่างหลายแบบ มีขนอ่อนบริเวณท้องใบ ดอกมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีขาวย สีขาวอมชมพูแต้มสีม่วง หรือสีขาวไล่เหลือง มีกลีบประดับ 2 กลีบรองรับอยู่ ซึ่งใบและต้นจะเริ่มแห้งเมื่อมีดอก ผลแห้งแตกได้ ต้นเปราะ ชอบดินร่วนปนทราย มีความชุ่มชื้นเพียงพอ เจริญได้ดีในที่ร่ม ไม่ชอบแสงแดดจัด สรรพคุณคือ นำเหง้ามาใช้เป็นเครื่องเทศและเครื่องยา ใบสดเป็นผักจิ้ม น้ำคั้นจากใบและเหง้าใช้ป้ายคอ เพื่อบรรเทาอาการเจ็บคอ (สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 4 กกอีสาน (152), 2543)

จากข้างต้นทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาการระบุชนิดของแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรไทย เพื่อศึกษานุกรมวิธานและฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อพืช และมีส่วนช่วยในการต่อต้านหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์หรือต่อยอดพัฒนาในด้านต่างๆต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษานุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกมาได้จากพืชสมุนไพรไทย ได้แก่ กะลา กระเจียวขาว และเปราะราศี เพื่อนำมาทำการระบุชนิดและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

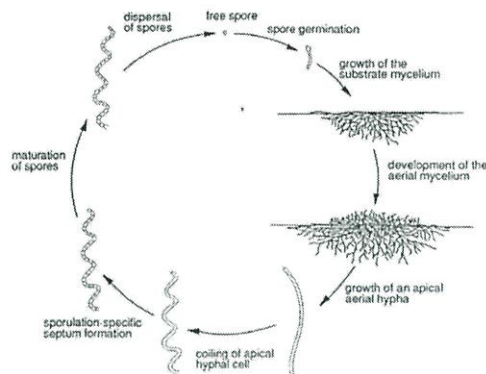
1. พบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ และ/หรือสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่างๆ
2. เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน order Actinomycetales (Miyadoh, 1997) และได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย (Goodfellow and Brand, 1980) โดยถูกจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง เนื่องจากมีลักษณะที่สำคัญ คือ ผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) กรดมิวรามิก (muramic acid) กรดไดอะมิโนไพเมอริก (diaminopimelic acid) แต่ไม่มีส่วนของไคติน (chitin) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบ แอคติโนมัยสีทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายตั้งแต่ลักษณะเป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) แอคติโนมัยสีท ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโตลักษณะของแอคติโนมัยสีทจะมีความสำคัญต่อการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ในระดับ Family และ Genus นอกจากนี้วิธีการทาง Chemotaxonomy เช่น การวิเคราะห์กรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และชนิดของน้ำตาลก็ยังมีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับที่ละเอียดมากขึ้น นอกจากนี้ยังอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสใน 16s และ 23s ribosomal RNA เพื่อช่วยจัดกลุ่มแบคทีเรียชนิดนี้ในระดับ species ได้อีกด้วย และลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้แอคติโนมัยสีทต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ คือ มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในดีเอ็นเอ มากกว่า 55 ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปมีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอต่ำกว่า 50 เช่น *Bacillus Clostridium Staphylococcus* และ *Streptococcus* (Glazer and Nikaido, 1994) และวัฏจักรชีวิตของแอคติโนมัยสีทดังภาพที่ 2.1 ซึ่งวัฏจักรชีวิตของแอคติโนมัยสีทจะเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยใต้พื้นผิวอาหารเพื่อใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตและภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์หรือในกรณีที่มีการขาดอาหารการขาดน้ำหรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



ภาพที่ 2.1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท
ที่มา : Chater และคณะ (1997)

2.1.1 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีท

2.1.1.1 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยแบคทีเรียเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยหนาแน่นการสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง (ภาพที่ 2.2) เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ส่วนของเส้นใยที่หักหรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม



ที่มา : Atlas of Actinomycetes (1997)

ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

- A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย
- B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปใ้อาหาร (substrate mycelium)
- C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

ลักษณะของโคโลนี

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก ของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัดทำให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียหรือเรียกแบบบางครั้งลักษณะคล้ายหนึ่งสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่ขนุน, เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจ เรียบ, นูน, ขรุขระ หรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี มีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีแอกติโนแบคทีเรีย

- 1) ลักษณะของโคโลนี (configuration) รูปร่างของโคโลนีบนจานอาหารอาจมีรูปร่างกลม (round) รูปร่างไม่แน่นอนและเจริญลามไปบนจานอาหาร (irregular and spreading) หรือเจริญเป็นเส้นคล้ายรากไม้ (rhizoid) เป็นต้น
- 2) ขนาด (size) โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็มจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร
- 3) การยกตัวของโคโลนี (elevation) จานพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหารอาจแบนราบหรือนูนจึงทำให้โคโลนียกตัวมีหลายแบบ
- 4) ขอบของโคโลนีจุลินทรีย์ (margin) มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ

2.1.1.2 โครงสร้างภายในเส้นใย

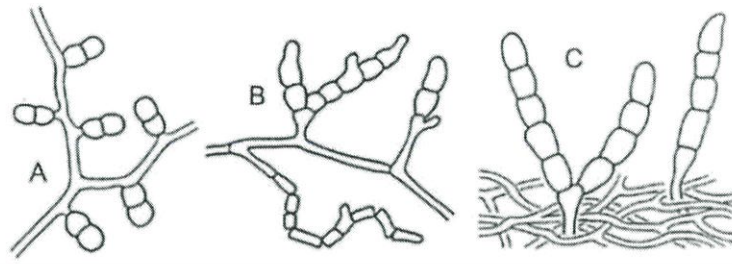
เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกันและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ในไซโตพลาสซึม ประกอบไปด้วยสาย ดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดมีไซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

การสร้างสปอร์

แอกติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบ่ง เป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

- 1) การสร้างสปอร์เดี่ยว การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สปอร์ติดอยู่กับฐานหรือพองตัวจากนั้น มีการสร้างผนังกันและสร้างเป็นผนังสปอร์ ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆ ที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางเราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora* , *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora* , *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (ภาพที่ 2.3)



ที่มา: Atlas of Actinomycetes (1997)

ภาพที่ 2.3 การสร้างสปอร์เดี่ยว

A: *Micromonospora* B: *Thermomonospora* C: *Saccharomonospora*

2) การสร้างสปอร์เป็นสาย ในแอคติโนมัยซีตที่เรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมากสามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั้นคือ di หรือ bisporous , oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (ภาพที่ 2.4) นอกจากนั้นสกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง



ที่มา: Atlas of Actinomycetes (1997)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะสปอร์เป็นสาย

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

B: และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

แอคติโนมัยซีตที่เรียที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

brevicatena สร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์ (ภาพที่ 2.4) บนสายใยอาหารในสปิชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ *N.brevicatena* และ *S.rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปิชีส์ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสปอร์สายสั้นๆ บนสายใยอากาศจำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ และจนถึง 10 -20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อน 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptoverticillium* มีลักษณะเฉพาะ คือ ก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกนสายสปอร์เป็นเกลียวซ้อนติดกันกับเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะเกิดการบิดสายสปอร์สั้นอาจจะตรงโค้งงอปลายเป็นขอ การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora* , *Microcelosporia* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้นหรือสายสั้นๆ บนสายใยอาหาร สายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์กลม *Catellatopora* สายสปอร์มีลักษณะตรงงอโค้งงอ มีสปอร์ 5 – 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหารเป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง

แอกติโนแบคทีเรีย ที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญ สปิชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ (ภาพที่ 2.5) สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีสปอร์มากกว่ามัก เรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มรา ในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใยความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ คือ

- 1) Rectiflexibiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือ โค้งงอ
- 2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขง (hook) เป็นวงเปิด หรือ เป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
- 3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบ คือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิด เกลียวยาวยึดไม่ติดกันแน่น
- 4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงกันแน่น

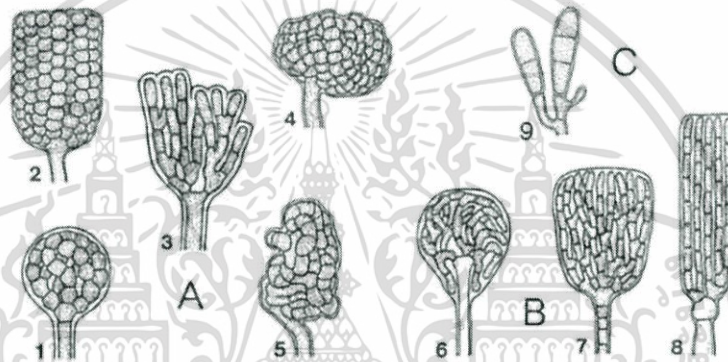
ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ Pycnidia นอกจากนั้นในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiosis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง, งอ หรือ ชิกแซก

3) การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมายสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์เป็น 2 กลุ่ม

3.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม (ภาพที่ 2.5) สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Atinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหารมีรูป ทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งมีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกัน หรือ วกวนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ Oliosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ



ที่มา: Atlas of Actinomycetes (1997)

ภาพที่ 2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*)

1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู่ 4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง

B: สกุล *Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก

C: สกุล *Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก

3.2) กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกัน อยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกัน เป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในสปอร์อับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ในภายในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ สกุล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spirillospora มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแหง และโค้งงอ

2.1.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอกติโนมัยซีทจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (major wall amino acid) และชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolyzed) สามารถแบ่งผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทออกได้เป็น 4 ชนิดแสดงดังตารางที่ 2.1 และสามารถจัดแบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีทได้ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท

Type	Major amino acids	Distinguishing major constituent
I	L-Diaminopimelic acid (L-DAP)	Glycine
II	<i>meso</i> -Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP)	Glycine
III	<i>meso</i> *-Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP or OH-DAP)	None
IV	<i>meso</i> -Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP)	None

ตารางที่ 2.2 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีท

Pattern	Sugar			Xylose
	Arabinose	Galactose	Madurose*	
A	+	+		
B			+	
C		No diagnostic sugar		
D	+			+

หมายเหตุ *Madurose คือ 3-O-methyl-D-galactose

ที่มา: Bergey's Manual of systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989)

1.1.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท (Classification of actinomycetes)

โดยทั่วไปการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร โคนินเดีย สปอร์และอับสปอร์นอกจากที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นสามารถจัดแบ่งกลุ่มโดยอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รูปแบบของฟอสโฟลิปิด และ ประเภทของมีนาควิโนน เป็นต้น เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ในการพิจารณาทำให้สามารถจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ Nocardioform actinomycetes Actinomycetes with multilocular sporangia Actinoplanetes Streptomycetes Maduromycetes Thermomonospora Thermoactinomycetes และสกุลอื่นๆ ที่ไม่สามารถจัดอยู่กลุ่มที่กล่าวมาได้โดยอาศัยการจัดจำแนกจาก Bergey's Manual of systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989)

2.1.3.1 Nocardioform actinomycetes

แอกติโนมัยซีท์ในกลุ่มนี้มีลักษณะที่แตกต่างกัน ส่วนมากจะมีการแตกหักของเส้นใยเป็นแบบแท่งหรือกลม บางสายพันธุ์มีการสร้างเส้นใยอากาศ บางสายพันธุ์สามารถสร้างโคนิเดีย Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดีย แอกติโนมัยซีท์กลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I (L – DAP และ glycine) ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose) โดยสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* มีเปอร์เซ็นต์ G+C ใน DNA อยู่ระหว่าง 64-72 เปอร์เซ็นต์และ 60-69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

2.1.3.2 Actinomycetes with multilocular sporangia

เชื้อในกลุ่มนี้มีการสร้างผนังกันแบบตามยาวและแบบตามขวาง สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ แอกติโนมัยซีท์ในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุลได้แก่ *Dermatophilus Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือ เชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสายง่ายๆ ที่ยังไม่พัฒนามากนัก thallus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสายจะมีการพัฒนามากขึ้นมีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาวโดยทั้งสองสายพันธุ์ข้างต้น สร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้และสกุล *Frankia* สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ในสภาพไมโครแอโรฟิลิก มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้และทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium)

2.1.3.3 Actinoplanetes

แอกติโนมัยซีท์ในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 5 สกุลได้แก่ *Actinoplanes Ampullariella Pilimelia Dactylosporangium* และ *Micromonospora* โดยส่วนมากเชื้อในกลุ่มนี้อยู่ในน้ำเพราะสร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงชีวิต ซึ่งเชื้อที่มีการสร้างเส้นใยที่แข็งแรง ไม่เอกลักษณะนี้เป็นเอกลักษณะที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบการสร้างเส้นใยอากาศหรือมีการสร้างน้อย สปอร์เคลื่อนที่ได้ภายในอับสปอร์ (sporangia หรือ vesicles) ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรืออาจเป็นเส้นใยของ sporogenous hyphae ตรงหรือขดเป็นเกลียวส่วนของ multispore sporangia มีหลายรูปร่าง ได้แก่ เชื้อในสกุล *Actinoplanes* *Ampullariella* *Pilimelia* และ *Dactylosporangium* ยกเว้น *Micromonospora* ที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile spore) สร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลมรูปไข่หรือวงรีผนังหนานบางบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนังและลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือเจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์เป็นสายอยู่บนเส้นใยที่มีผนังกัน ผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso – DAP และ OH – DAP) และน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (Xylose และ Arabinose)

2.1.3.4 Streptomycetes

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 5 สกุล ได้แก่ *Streptomyces* *Streptoverticillium* *Kineosporia* *Intrasporangium* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือเส้นใยอากาศ เป็นแบบไม่มีผนังกัน และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป เช่น *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ส่วนในสกุล *Kineosporia*, *Intrasporangium* และ *Sporichthya* มีการสร้างสายใยอากาศน้อยหรืออาจไม่สร้าง และสปอร์มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ลักษณะบริเวณผิวของโคโลนีมีลักษณะย่นเมื่อมีอายุมาก สปอร์ที่สร้างขึ้นบริเวณผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผงเชื้อในกลุ่มนี้มี L – DAP ผนังเซลล์ เป็นแบบ I และมีไกลซีนเป็นองค์ประกอบ

2.1.3.5 Maduromycetes

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ได้แก่ *Actinomadura* *Microbispora* *Microtetrastora* *Planobispora* *Planomonospora* *Spirillospora* และ *Streptosporangium* กลุ่มนี้เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนงไม่มีสปอร์แต่มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้นๆ หรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ โดยพบว่าในสกุล *Microbispora* มีการสร้างสปอร์สายสั้นๆ แบบสองสปอร์ (disporous) ในสกุล *Actinomadura* มีการสร้างสปอร์แบบหลากหลาย ในบางสายพันธุ์มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์แบบเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora*, *Planomonospora* และ *Spirillospora* ส่วนสายพันธุ์มีการสร้างสปอร์แบบเคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ *Streptosporangium* ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มนี้เป็นแบบ III (meso– DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.6 Thermomonospora

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ได้แก่ *Thermomonospora Actinosynema Nocardiosis* และ *Streptoalloterichus* โดยพบว่า *Thermomonospora* สร้างสปอร์แบบเดี่ยว ส่วนเชื้อ *Actinosynema* และ *Nocardiosis* สร้างสปอร์เป็นสาย และเชื้อในกลุ่มของ *Streptoalloterichus* สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์โดยเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูขึ้นในอากาศผนังเซลล์เป็นแบบ III (*meso - DAP*) ไม่มี mycolic acid ในชั้นเปปทิโดไกลแคนแต่มีฟอสโฟลิพิด มีนาควิโนน และ กรดไขมันเป็นองค์ประกอบในเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่มี MK-9(H4, H6 และ H8) เป็น isoprenologes เช่น *Thermomonospora sensu stricto* *Thermomonospora curvata* เป็นต้น กลุ่มที่มี MK-9(H2) และ MK-9(III,VIII-H4) เป็น isoprenologes เช่น *Thermomonospora chromogena* *Thermomonospora mesophila* และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มี MK-10(H6และH8) เป็น isoprenologes เช่น *Thermomonospora alba* *Thermomonospora fusa* และ *Thermomonospora mesouviriformis* เป็นต้น

2.1.3.7 Thermoactinomyces

ในกลุ่มนี้มี *Thermoactinomyces* เพียงสกุลเดียว เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง สร้างสปอร์เดี่ยวซึ่งเป็นเอนโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติของเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ G+C ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสีททั่วไปแต่กลับมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพวก *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดีและมีสัณฐานวิทยาที่ต่างจากพวก *Bacillus* นอกจากนั้นกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยชูขึ้นในอากาศพวก *Thermoactinomyces dichotomus* มีสีเหลืองส่วนอื่นจะมีสีขาว ทุกสปีชีส์เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญและเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายเศษซาก และเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III (*meso-DAP*) แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาลและกรดอะมิโน ส่วนมีนาควิโนนเป็นแบบไม่มีอิมตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์มีกรดไดฟิโนลิติกอยู่ด้วย

2.1.3.8 กลุ่มอื่นๆ

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอกติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆไม่ได้ทำให้ไม่สามารถจัดเข้าอยู่ในกลุ่มอื่นได้มี 4 สกุล ประกอบด้วย *Glycomyces Kibdelosporangium Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* โดยพบว่าทุกสกุลมีการสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ ดังนั้นสามารถสรุปลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสีทดังแสดงในตารางที่ 2.3 และการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทดังแสดงในตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยซีททั้ง 7 กลุ่ม

Group	Cell wall type	Cell sugar patterns	Mol % G+C	Sporangia
Nocardioforms	I	A	59-79	-
Multilocular sporangia	III	B,C,D	57-75	+ / -
Actinoplanetes	II	D	71-73	+
Streptomycetes	I	-	69-78	-
Maduromycetes	III	B,C	64-74	+ / -
Thermomonospora	III	major C	64-73	-
Thermoactinomycetes	III	C	52-55	-

ที่มา : Glazer และ Nikaido (1994)

ตารางที่ 2.4 การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยซีทใน Order Actinomycetales

Order	Families	Genera
Actinomycetales	Actinomycetaceae	
	Micrococcaceae	
	Bogoriellaceae	<i>Bogoriella</i>
	Rarobacteraceae	<i>Rarobacter</i>
	Sanguibacteraceae	<i>Sanguibacter</i>
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>
		<i>Oerskovia</i>
	Dermabacteraceae	<i>Dermabacter</i>
		<i>Brachybacterium</i>
	Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>
	Demacoccaceae	
	Utrasporangiaceae	
	Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>
	Microbacteriaceae	<i>Beutenbergia</i>
	Beutenbergiaceae	<i>Promicromonospora</i>
	Promicromonosporaceae	<i>Corynebacterium</i>
	Corynebacteriaceae	<i>Dietzia</i>
	Dietziaceae	<i>Gordonia</i>
	Gordoniaceae	<i>Skermania</i>
		<i>Nocunlia</i>
	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>
	Williamsiaceae	<i>Williamsia</i>

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

Order	Families	Genera
Actinomycetales	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>
	Micromonosporaceae	
	Propionibacteriaceae	
	Nocardioidaceae	
	Pseudonocardiaceae	
	Actinosynnemataceae	
	Streptomycetaceae	
	Streptosporangiaceae	
	Thermomonosporaceae	<i>Thermobifida</i>
	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
	Geodermatophilaceae	
	Microspheraceae	<i>Sporichthya</i>
	Sporichthyaceae	<i>Acidothermus</i>
	Acidothermaceae	
Kineosporiaceae	<i>Glycomyces</i>	
Glycomycetaceae		

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

2.1.4 แหล่งของแอกติโนมัยสีท

ดินเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดที่พบแอกติโนมัยสีท โดยสามารถพบเป็นจำนวนประมาณ 10 เพอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน (Janssen, 2006) แอกติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (saprophyte) ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และย่อยสลายสารประกอบจำพวกพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน ไคติน สามารถพบแอกติโนมัยสีทในดินที่มีฮิวมัสและแคลเซียม คาร์บอนเนตเป็นจำนวนมากถึง 10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Goodfellow and Williams, 1983) ในขณะที่ดินที่มีน้ำขัง ไม่มีออกซิเจนและดินที่เป็นกรดจะพบแอกติโนมัยสีทในจำนวนที่น้อยกว่า คือ $10^2 - 10^3$ เซลล์ต่อน้ำหนักดินแห้ง (Williams and Wellington, 1982)

ชนินทร์ และคณะ (2546) รายงานการคัดแยกแอกติโนมัยสีทจากดินในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์หายขาด โดยคัดแยกได้แอกติโนมัยสีท 160 และ 186 ไอโซเลทตามลำดับ ส่วนใหญ่เป็นแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* และพบแอกติโนมัยสีทในกลุ่มที่ยากจำนวน 10 สกุล คือ *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Microbispora*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micromonospora, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* และ *Streptosporangium*

ชาญวิทย์ และคณะ (2546) พบแอกติโนมัยสีทในกลุ่มที่หายากจำนวน 120 ไอโซเลท จากดินป่าในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกกราชและไร่สุวรรณ โดยพบสกุล *Micromonospora* มากที่สุดจำนวน 32 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่น ซึ่งได้แก่ *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Catellatospora*, *Dactylosporangium*, *Herbidosporea*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* และ *Streptosporangium*

Wang et al. (2001) รายงานการค้นพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Actinopolymorpha* จากดินในป่าเขตร้อน (tropical rainforest) ในประเทศสิงคโปร์ นอกจากนี้สามารถพบแอกติโนมัยสีทจากดินในป่าต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือและอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนในสิงคโปร์ ป่าภูเขาในญี่ปุ่น ป่าใบแข็งในออสเตรเลีย เป็นต้น (Jayasinghe and Parkinson, 2008)

Wang et al. (2006) พบแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptacidiphilus* ในดินนาข้าวของประเทศไทย ส่วน Zitouni et al. (2005) คัดแยกแอกติโนมัยสีทจากทะเลทรายซาฮารา ประเทศอัลจีเรีย พบแอกติโนมัยสีทสกุล *Nocardiopsis* และ *Saccharothrix* จำนวน 54 และ 32 ไอโซเลท ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Pseudonocadia* ในดินเขตแอนตาร์ติกที่แห้งแล้งแถบขั้วโลกใต้ (Prabahar et al., 2004)

แอกติโนมัยสีทที่อาศัยบริเวณดินรอบรากพืช พบว่ามีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญแก่พืชช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคที่มีรายงานไว้ เช่น *Micromonospora carbonacea* สามารถเข้าอยู่อาศัยในรากกะหล่ำและในดินห่างจากบริเวณรอบราก 4 เซนติเมตร และช่วยป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotinia minor* (El-Tarabily et al., 2000)

Gesheva (2002) คัดแยกแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* จากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลส้ม (*Citrus limon* และ *C. sinensis*) และคัดแยกได้ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ polyethers, azalomycin B และ nonpolyenic macrolide antibiotics Jimnez-Esquiln and Roane (2005) รายงานว่าจำนวนแอกติโนมัยสีทในดินบริเวณรอบรากพืชจำพวก *Artemisia* ที่ระดับสูงกว่าระดับน้ำทะเลมีจำนวนมากกว่าที่ระดับต่ำกว่า ระดับน้ำทะเล และมี 4 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้กว้าง ซึ่งทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*

El-Tarabily (2006) รายงานความสัมพันธ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชและแอกติโนมัยสีทที่อาศัยบริเวณดินรอบราก โดยเอนโดไฟท์ที่พบในรากส่วนใหญ่สามารถพบได้ในดินรอบรากเช่นกัน มีรายงานว่า *Actinoplanes philippinensis*, *Micromonospora chalcone* และ *Microbispora rosea* สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในรากและดินบริเวณรอบราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

El-Tarabily *et al.* (2008) รายงานว่า *Micromonospora endolithica* ที่คัดแยกจากดิน และมีความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในรากและดินรอบรากต้นถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) สามารถละลายฟอสเฟตในดินในรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่ว

Karthikeyan *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทที่อาศัยบริเวณดินรอบรากของพืชที่ใช้เป็นยาจำนวน 4 ชนิด คือ *Ocimum sanctum*, *Coleus forskohli*, *Catharanthus* และ *Aloe vera* โดยพบแอกติโนมัยสีทจำนวน 12.22×10^5 , 10.44×10^5 , 8.44×10^5 colony forming unit (CFU) ต่อดินหนึ่งกรัม ตามลำดับ

น้ำเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถพบแอกติโนมัยสีท มีรายงานว่าแอกติโนมัยสีทในแหล่งน้ำสามารถย่อยสลายสารที่เป็นพิษ เช่น ฟีนอล และสามารถผลิตเอนไซม์และสารเมแทบอลิท์ที่มีประโยชน์อื่นๆ เช่น เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และไฟบริโนไลซิน (fibrinolysin) (Jiang and Xu, 1996) เป็นต้น แอกติโนมัยสีทสามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำเค็ม ดินตะกอนใต้ทะเล (Colquhoun *et al.*, 1998; Pathom-aree *et al.*, 2006) รวมถึงพืชและสัตว์ที่อยู่ใต้ทะเล (Zheng *et al.*, 2000) สาหร่ายและฟองน้ำ (Jensen *et al.*, 2005) แอกติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีรายงานไว้ ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และ *Streptomyces* (Jiang and Xu, 1996; Terkina *et al.*, 2002)

แหล่งอื่นที่มีรายงานว่าสามารถพบแอกติโนมัยสีท ได้แก่ พื้นผิวของหินในเหมือง หินชนวนยุคกลาง (medieval slate mine) (Carlsohn *et al.*, 2007) หินและกรวดในเขตแอนตาร์กติก (Hirsch *et al.*, 2004; Prabahaar *et al.*, 2004) และไนโลเคน (Gonzalez *et al.*, 2005) เป็นต้น

2.1.5 การคัดแยกแอกติโนมัยสีท

ปัจจัยที่มีผลต่อการคัดแยกแอกติโนมัยสีทมีหลายประการ เช่น ชนิดของตัวอย่างที่ศึกษา เทคนิคที่ใช้ในการคัดแยก อาหารที่ใช้คัดแยกและอุณหภูมิในการบ่ม เป็นต้น ในการเก็บตัวอย่างดินหรือน้ำที่ระดับความลึกต่างกันหรือจากแหล่งต่างกัน ก็จะมีจำนวนและชนิดของแอกติโนมัยสีทที่แตกต่างกัน การคัดแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชต้องเลือกต้นพืชที่แข็งแรง ไม่มีร่องรอยการเข้าทำลายของโรคและแมลง

เทคนิคที่ใช้ในการคัดแยกเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการคัดแยกแอกติโนมัยสีท ซึ่งมีทั้งการใช้วิธีทางกายภาพ (Physical treatment) และการใช้สารเคมี (Chemical treatment) การใช้วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การผึ่งให้แห้ง (air drying) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ การทำให้แห้งด้วยความร้อน (dried heat) โดยการนำตัวอย่างดินไปอบที่อุณหภูมิสูงเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการรวมถึงแอกติโนมัยสีทในจีนัส *Streptomyces* (Nonomura and Hayakawa, 1988) หรือการใช้ความร้อนชื้น (moist heat) โดยการเจือจางตัวอย่างก่อนนำไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียอื่นที่ไม่ต้องการ (Zakharova *et al.*, 2003)

การใช้สารเคมีสำหรับคัดเลือกแอคติโนมัยสีทในกลุ่มที่หายาก โดยจุลินทรีย์ที่เจริญเร็ว เช่น แบคทีเรีย และ *Streptomyces* จะถูกทำลายในระหว่างการบ่มสารแขวนลอยดิน สารที่ใช้มีทั้งชนิดที่เป็นตัวทำลาย สารลดแรงตึงผิว กรด ต่าง เช่น สารละลาย SDS เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ chloramine-T และ benzethonium chloride (BC) เข้มข้น 0.01-0.03 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (Hayakawa, 2008)

Hayakawa *et al.* (1991) คัดแยกแอคติโนมัยสีทโดยใช้วิธีทางกายภาพและชีวภาพร่วมกัน โดยอบตัวอย่างดินที่ 120 องศาเซลเซียส ก่อนนำตัวอย่างมาเจือจางและใช้ benzethonium chloride 0.01%-0.03% เพื่อกำจัดแบคทีเรียเซลล์เดียว รวมถึงแอคติโนมัยสีทที่ไม่ต้องการ เช่น *Streptomyces* ทำให้ คัด แยก ได้ แอ คติ โนมัย สี ท ใน ส ก ล *Streptosporangium* และ *Dactylosporangium*

สำหรับแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ลำต้น ราก จำเป็นต้องมีวิธีการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวออกไปก่อน วิธีดังกล่าวเรียกว่า Surface-sterilization ในปี ค.ศ. 1997 Hallman *et al.* ได้คิดค้นวิธีการกำจัดจุลินทรีย์โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์และโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสารกำจัดจุลินทรีย์ที่ได้ผลดี ตัวอย่างเช่น Taechowisan and Lumyong (2003) ใช้วิธีเขย่าตัวอย่างชิ้นรากในสารละลาย Tween20 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 5 นาที เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่พื้นผิว ส่วน Tian *et al.* (2007) จุ่มชิ้นพืชที่ผ่านขั้นตอนการทำ surface sterilized เรียบร้อยแล้วลงใน 10 NaHCO₃ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหวังเห็นผลการเจริญของเอนโดไฟต์ดิงฟิงใจ

ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการคัดแยกแอคติโนมัยสีทคืออาหารคัดแยกเชื้อและสารปฏิชีวนะที่ใช้ ซึ่งอาหารสำหรับคัดแยกแอคติโนมัยสีทจะมีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีองค์ประกอบที่ย่อยสลายยาก เช่น แป้ง เคซีน ไคติน กรดฮิวมิก ซึ่งแอคติโนมัยสีทสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญ ในขณะที่ราและแบคทีเรียอื่นๆ ไม่สามารถนำมาใช้หรือนำไปใช้ได้ยาก สูตรอาหารที่นิยมใช้ ได้แก่ starch-casein agar (Kster and Williams, 1964) humic acid vitamin (HV) agar (Hayakawa and Nonomura, 1987) หรือ soil-extract agar medium (Hamaki *et al.*, 2005) ซึ่งเหมาะสำหรับคัดแยกแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่หายากและแอคติโนมัยสีทที่ไม่เจริญได้บนอาหารทั่วๆ ไป เช่น *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Microbispora* และ *Frankia* เป็นต้น

อาหาร LSV-SE มีส่วนประกอบของ kraft lignin ที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน คิดค้นโดย Hayakawa *et al.* (1996) อาหารดังกล่าวช่วยสนับสนุนการคัดแยกแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม *Microtetraspora* ได้ดี ส่วน Nonomura and Ohara (1969) ใช้อาหาร arginine vitamin agar ในการแยก *Microbispora* และ *Streptosporangium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งราและเติมลงในอาหารคัดแยกแอสโคดิโนมัยซิส ได้แก่ nystatin, cycloheximide, ketoconazole สารปฏิชีวนะเหล่านี้มีผลยับยั้งการเจริญของราหรือทำให้รามีขนาดโคโลนีที่เล็กลง ส่วนสารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียมีจำนวนมากขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการคัดแยก เช่น งานวิจัยของ Zakharova *et al.* (2003) ใช้สารปฏิชีวนะ nalidixic acid ยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่สร้างเส้นใย และใช้ rubomycin กับ carminomycin เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มสเตรปโตมัยซิส สำหรับคัดแยกแอสโคดิโนมัยซิสในสกุล *Actinomadura* หรือ Hayakawa *et al.* (1991) พบว่าการเติม leucomycin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีโอกาสได้แอสโคดิโนมัยซิสในสกุล *Streptosporangium* เพิ่มมากขึ้น

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงและคัดแยกแอสโคดิโนมัยซิสคือที่ 25-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากแอสโคดิโนมัยซิสส่วนใหญ่เป็น mesophile (Williams *et al.*, 1989) การคัดแยก *Streptomyces* ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 7-14 วัน ในขณะที่ *Micromonospora* ต้องใช้เวลา 14-21 วัน ถ้าหากต้องการแยกแอสโคดิโนมัยซิสที่หายากอาจต้องใช้เวลา 3-5 สัปดาห์ (Shearer, 1997)

2.1.6 ประโยชน์ของแอสโคดิโนมัยซิส

1. สร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer)
3. ผลิตเอนไซม์และวิตามิน
4. การประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol)

มีการศึกษาการใช้แอสโคดิโนมัยซิสเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น การคลุกดินด้วยสปอร์ของแอสโคดิโนมัยซิสสกุล *Streptomyces* สามารถควบคุมโรครากเน่าและลดจำนวนพยาธิตัวกลม (nematode) ในถั่วอัลฟาลฟาได้ (Jones and Samac, 1996; Samac and Kinkel, 2001; Xiao *et al.*, 2002)

การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชด้วยสปอร์หรือน้ำเลี้ยงเซลล์แอสโคดิโนมัยซิสสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ เช่น งานวิจัยของ Shih *et al.* (2003) เมื่อนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้มีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค damping off และ root rot ที่เกิดจาก *R. solani* ในถั่วและมะเขือเทศด้วยเช่นกัน (Rothrock and Gottlieb, 1984; Sabaratnam and Traquair, 2002)

Singh and Mehrotra (1980) เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *Rhizoctonia bataticola* และช่วยเพิ่มความยาวของราก นอกจากนี้ยังสามารถลดอาการใบร่วงที่เกิดจาก *Phoma medicaginis* ในถั่วอัลฟาลฟา (Samac *et al.*, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

El-Abyad *et al.* (1993) เคลือบเมล็ดมะเขือด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ก่อนนำไปปลูก พบว่าสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดี นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* และ *S. canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์จาก *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Verticillium albo-atrum* และ *Alternaria solani* และยังมีการศึกษาการใช้สเตรปโตมัยซีทควบคุมเชื้อราก่อโรคที่รากและเชื้อราก่อโรคในเมล็ด (Kortema *et al.*, 1994; Tahvonon *et al.*, 1995)

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ โคโมไทป์ และจีโนไทป์ ดังนี้

2.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype characteristic)

เป็นลักษณะต่างๆที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญชีวิตเคมี และสรีรวิทยาของเชื้อ ลักษณะทางฟีโนไทป์นี้เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนซึ่งมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียมักมีการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียทั่วไป ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ศึกษา ได้แก่

2.2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

มักทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทนั้นสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อได้ เส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท 2 ชนิด ได้แก่ เส้นใยอากาศ ซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างชูขึ้นไปบนอากาศ และเส้นใยอาหาร ซึ่งเป็นเส้นใยที่สร้างแทงลงบนผิวอาหาร มีหน้าที่ในการดูดซึมอาหาร มาเลี้ยงส่วนต่างๆ ของเซลล์ เชื้อ แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มักสร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด แต่มีบางชนิดไม่สร้างเส้นใยอากาศ เช่น เชื้อสกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) เป็นต้น

สปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ใหญ่ๆ คือ สปอร์เปลือย (naked Spore) เช่น โคนิเดีย (conidia) และสปอร์ที่อยู่ในถุงหุ้ม (sporangium) เช่น สปอร์แรงจิโอสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อสามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้เช่นกัน ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีท สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบแรก endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic actinomycetes เช่น *Thermoactinomyces* และ *Actinobifida* และแบบที่ 2 คือ exogenous formation แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ exogenous โดยเฉพาะ *Streptomyces* spp. Vobis(1997) ได้อธิบายไว้ในหนังสือ Atlas of Actinomycetes เกี่ยวกับลักษณะของสปอร์ไว้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สปอร์แบบเดี่ยว (Single spore)

กลุ่มที่ผลิตสปอร์เดี่ยวเรียกว่า “monosporous” เช่น ลักษณะสปอร์ของเชื้อสกุล ไมโครโมนอสปอรา (*Micromonospora*) มีก้านชูสปอร์เกิดบริเวณเส้นใยอาหาร สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น การเกิดสปอร์เริ่มจากการโป่งพองบริเวณปลายของเส้นใยลงมาจนถึงผนังก้านจนมีการพองมตัวเป็นผนังสปอร์ เชื้อสกุลเทอร์โมโมนอสปอรา (*Thermomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ บริเวณปลายเส้นใยอาจมีหรือไม่มี การแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์เชื้อสกุล แซคคาโรโมนอสปอรา (*Saccharomonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยวมีการพัฒนาบนเส้นใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกกิ่งก้าน ลักษณะของสปอร์เป็นวงหรืออยู่บนก้านชูที่มีขนาดสั้น

2. สปอร์มีลักษณะเรียงตัวเป็นเส้นสาย (spores formed in chains)

สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสายเกิดจากการแบ่งแยกตามขวางของผนัง การแบ่งผนังส่วนนี้ทำให้มีการเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ ลักษณะของสปอร์ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้จำแนกลักษณะรูปร่าง ความยาว หรือจำนวนของสปอร์ที่แบ่งได้เช่น disporous หรือ bisporous หมายถึงสปอร์แบบคู่ oligosporous หมายถึงสปอร์จำนวนเล็กน้อย และ polysporous หมายถึงสปอร์จำนวนมากกว่า 2 ขึ้นไป

สปอร์แบบคู่ (disporous) ประกอบด้วยสปอร์ที่อยู่เป็นคู่ตามยาว ได้แก่ เชื้อสกุล ไมโครโมนอสปอรา (*Micromonospora*) มีเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ขนาด 2 ไมโครเมตร และมีชั้นที่หนาเป็น 3 ถึง 4 เท่า ของเส้นใยโคโลนี ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นมาก การเกิดของสปอร์ในช่วงแรกเกิดจากการแยกตัวออกตามความยาวจากเส้นใยอากาศ ทำให้เกิดถึงก้านสั้นๆทางด้านข้าง ทำให้เกิดการโป่งพองและสร้างผนังก้านตามแนวขวาง

แอคติโนมัยซีทที่มีสปอร์จำนวนเล็กน้อย (oligosporous) มีการพัฒนาของสปอร์บนสายสั้นๆ ในแต่ละสายจะมีสปอร์อยู่ประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ หรือน้อยที่สุดคือมี 3 ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์ และสปอร์อาจแตกกิ่งก้านได้ และเส้นใยอาจมีการหักเป็นท่อนๆ เชื้อสกุลนอคาร์เดีย (*Nocardia*) มีสปอร์ 2 ถึง 7 สปอร์บนก้านชูที่มีขนาดสั้น เชื้อสกุลแอคติโนมอดูรา (*Actinomadura*) และไมโครเตตราสปอรา (*Microtetraspora*) เส้นสายของสปอร์มีขนาดสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศ โดยปกติแอคติโนมอดูรา (*Actinomadura*) มีจำนวนสปอร์มาก 10 ถึง 20 สปอร์บนสายเดียวกัน เส้นใยอาจมีลักษณะตรง โค้งงอ หรือเป็นเกลียวได้ เช่น เส้นสายสปอร์ของเชื้อ *Actinomadura pusila* มีลักษณะค่อนข้างหนาและเป็นเกลียว เชื้อในกลุ่มนี้มีสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสปอแรงเจียของเชื้อสกุลสเตรปโตสปอแรงเจียม (*Streptosporangium*) เรียกว่า ชูโตสปอแรงเจีย (*Pseudosporangia*) ลักษณะของสปอร์สายสั้นสามารถสังเกตได้จากเชื้อ *Sporichthya polymorpha* เส้นใยอากาศจะเกิดการแบ่งตัวจากรูปท่อนเป็นสปอร์ที่มีลักษณะกลม

กลุ่มของแอคติโนมัยซีทที่มีสปอร์จำนวนมาก (polysporous) ได้แก่ เชื้อในสกุลสเตรปโตมัยซีท (*Streptomyces*) ซึ่งมีการพองมรูปเป็นเส้นสายที่ยาว และมีมากกว่า 50 สปอร์ ลักษณะรูปร่างของสปอร์ในแต่ละสปีชีส์ของสเตรปโตมัยซีทจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปหลายรูปแบบ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อสปอร์ที่อยู่ภายในถุงบรรจุสปอร์หรือสปอแรนเจีย (spores formed within sporangia)

สปอร์ถูกหุ้มด้วยสปอแรนเจีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้ม สปอร์มีการพัฒนา และห่อหุ้มจนกระทั่งสปอร์แก่ จึงมีการปล่อยสปอร์ออกมาจากถุงหุ้ม สปอแรนเจียมีรูปร่างต่างๆได้หลายอย่าง เช่น รูปร่างกระบอกรูปร่างคล้ายหลอดหรือท่อ รูปร่างคล้ายขวด รูปร่างคล้ายร่ม หรือรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์มีขนาด 2 ถึง 50 ไมโครเมตร แต่โดยส่วนใหญ่จะมีขนาด 10 ไมโครเมตร

4. โครงสร้างอื่นๆ

แอคติโนมัยซีทบางชนิดมีลักษณะรูปร่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก บางชนิดอาจมีผนังที่หนา หรือมีรูปร่างเป็นทรงกลม บางชนิดสร้างสปอร์บริเวณแกนเส้นใย

2.2.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

1. คุณสมบัติในการย่อยโปรตีน

เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งในการแยกเชื้อ เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนหรือสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ต่างกัน การสร้างเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมี 2 รูปแบบคือ

- โคแอกกูเลชัน(coagulation) เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้จะปรากฏลักษณะให้เห็นคือ อาหารมีการรวมกลุ่ม หรือตกตะกอนเป็นก้อน ไม่เหลวเหมือนเดิม

- เปปโตไนเซชัน (peptonization) หากมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้น ลักษณะของอาหารจะเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส

2. คุณสมบัติในการย่อยเจลาติน (gelatin)

ความสามารถในการย่อย หรือทำให้เจลาตินเหลว มีประโยชน์ในการดูความแตกต่างของสปีชีส์ และชนิดของแบคทีเรีย เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลังของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แบคทีเรียย่อยเจลาตินโดยใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) เมื่อถูกย่อยเจลาตินจะสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเจล ซึ่งจะเป็นของเหลว ถึงแม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำ จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการทดสอบ

3. คุณสมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

การสลายตัวของไนเตรต เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) สามารถทดสอบได้โดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfamic acid) ก่อนแล้วตามด้วยแอลฟาแนปทิลลามีน (α -naphthylamine) การรวมตัวระหว่างกรดซัลฟานิลิกและไนเตรต จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salts) จะรวมตัวกับแนปทิลลามีน เกิดสีแดงของสีย้อมที่ละลายน้ำได้ (water-soluble azo dye)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. คุณสมบัติในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งของเชื้อ ซึ่งแป้งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน เมื่อต้มแป้งอะไมโลสจะละลาย แต่อะไมโลเพคตินจะไม่ละลาย ทั้งอะไมโลส และอะไมโลเพคติน มีองค์ประกอบของน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ใน อะไมโลส น้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมกันด้วยพันธะ 1,4- α -glucosidic ส่วนอะไมโลเพคติน มีทั้งพันธะ 1,4- α -glucosidic และ 1,6- α -glucosidic

การทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรียใช้สารละลายไอโอดีนหยดลงบนผิวอาหาร และถ้าเกิดสีแดงถึงสีม่วงบนผิวอาหารแสดงว่าแป้งไม่ถูกย่อย แต่ถ้าไม่ปรากฏสีบนผิวอาหารแสดงว่าบริเวณนั้นมีการย่อยแป้ง

5. คุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอาหารที่เป็นด่าง แต่มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ 5 ดังนั้นในการทดสอบคุณสมบัติในการทนความเป็นกรด-ด่าง จึงเป็นการจัดจำแนก และจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น

6. ความสามารถในการทนเกลือ

ในการทดสอบความสามารถในการทนเกลือของเชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเจริญในสภาวะที่มีระดับเกลือต่างๆ รวมทั้งสามารถบอกถึงสภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนั้นๆได้ด้วย

7. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ้าดูจากอุณหภูมิสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 พวก คือ พวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria ถ้าชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง เรียกว่า mesophilic bacteria และถ้าชอบเจริญในอุณหภูมิต่ำเรียกว่า psychrophilic bacteria ดังนั้น ในการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกันนี้ จึงสามารถช่วยในการจัดจำแนก และแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีทได้เช่นกัน

2.2.2 ลักษณะทางเคมีทั่วไป

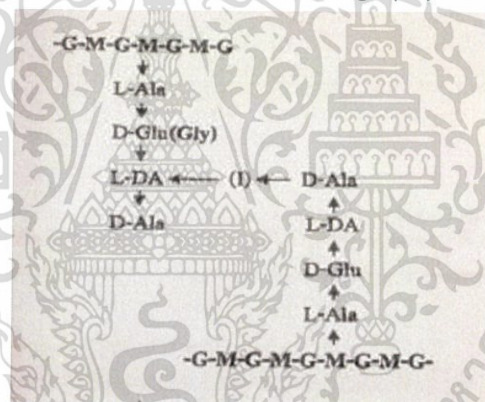
เป็นการศึกษาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างต่างๆของเซลล์ ได้แก่

2.2.2.1 กรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid, DAP)

แบคทีเรียเกือบทุกชนิดมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือเรียกว่า มิวรีน (murein) เปปติโดไกลแคน (รูปที่ 2.6) เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ เอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine) เรียงสลับกับกรดเอ็น-อะซีทิลมิวรามิก (*N*-acetylmuramic acid) โดยที่กรดเอ็น-อะซีทิลมิวรามิกจะมีกรดอะมิโนยื่นออกมา และจะไปเชื่อมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนของกรดเอ็น-อะซิดิลมีวรามิกของอิกโมเลกุลหนึ่งด้วยพันธะเปปไทด์ จำนวนและชนิดของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งชนิดของกรดอะมิโนที่พบในเปปทิโดไกลแคนนี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการจัดระบบของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งรวมเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วย โดยกรด 2,6-ไดอะมิโนพิเมลิก (2,6-diaminopimelic : DAP) เป็นกรดอะมิโนพิเมลิกที่สามารถพบได้ในเปปทิโดไกลแคน มีไอโซเมอร์ 2 แบบคือ LL และแบบ meso (DL, DD) ถ้าในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีกรดไดอะมิโน พิเมลิกประกอบอยู่ จะมีไอโซเมอร์ได้ 1 ชนิดเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่ง ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย การตรวจสอบกรดไดอะมิโนพิเมลิก และไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกนั้นเป็นขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบนั้นโดยปกติแล้วจะพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso ในเปปทิโดไกลแคนได้ทั่วไปในปริมาณน้อย ซึ่งการพบไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso ในแบคทีเรียแกรมลบนี้นี้ ไม่มีความสำคัญในการใช้จัดระบบของเชื้อ ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกสามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกจะถูกแยกโดยใช้แผ่น โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน

G คือ N-acetylglucosamine; M คือ N-acetyl(glycolyl)muramic acid; Ala คือ alanine; Glu คือ glutamic acid; Gly คือ glycerine; L-DA คือ L-diaminoacid; I คือ interpeptide bridge

เชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ LL ซึ่งจัดเป็นแอคติโนมัยซีททั่วไป (common actinomycetes) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลอื่นๆ จัดเป็นแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) มีลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นแบบ meso แต่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทบางสกุล เช่น *Kitasatospora* มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกทั้ง 2 แบบ คือ แบบ LL และ แบบ meso นอกจากนี้ยังสามารถพบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy-DAP) ได้ในเชื้อแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์ เช่น ในสกุล *Actinoplanes Ampullariella Dactylosporangium* และ *Micromonospora* ซึ่งกรณีที่พบกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ 3-ไฮดรอกซีนี้นั้นมักจะพบควบคู่กับกรดไดอะมิโนพิเมลิกแบบ meso ไอโซเมอร์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่มีความสำคัญในการ ใช้จัดกลุ่มผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ดังในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

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

+ คือ แสดงการตรวจพบ, *คือ อาจตรวจพบหรือไม่พบ glycine, **คือ อาจตรวจพบ hydroxyl

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

2.2.2.2 ชนิดของ acyl ในผนังเซลล์ (acyl type)

ผนังเซลล์เปปทิโดไกลแคนประกอบด้วยเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน เรียงสลับกับกรด เอ็น-อะซิติลไมวรามิกโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1.4 กลูโคซิดิก (β -1,4glucosidic) ในแบคทีเรียบางชนิด อาจพบในหมู่ไกลโคลิล (glycolyl group) แทนที่ตำแหน่งของหมู่อะซิติล (acetyl group) ในโครงสร้างของกรดไมวรามิก โดยลักษณะของชนิดไกลโคลิล (glycolyl type) ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียนั้นสามารถพบได้ในเชื้อแอคติโนมัยซีทและแบคทีเรียจำพวกโครีนีฟอร์ม (coryneform bacteria) การศึกษานี้มีประโยชน์ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียการตรวจสอบสามารถทำได้โดยวิเคราะห์สี ทำให้สามารถตรวจสอบปริมาณกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ในระดับไมโครโมลล์ต่อมิลลิกรัมของเซลล์แห้งได้ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบปริมาณมักไม่ใช้ในการจัดระบบแบคทีเรีย ชนิดของ acyl ที่พบได้เป็นส่วนมากในเชื้อแอคติโนมัยซีทวงศ์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ชนิดของ acyl ที่พบเป็นส่วนมาก (major) ในเชื้อแอคติโนมัยสีทวงศ์ต่างๆ

วงศ์	ชนิดของ acyl
<i>Cellulomonadaceae</i>	Acetyl
<i>Dermatophilaceae</i>	Acetyl
<i>Frankiaceae</i>	Acetyl
<i>Micromonosporaceae</i>	Glycolyl
<i>Mycobacteriaceae</i>	Glycolyl
<i>Nocardiaceae</i>	Glycolyl
<i>Nocardioideae</i>	Acetyl
<i>Pseudonocardiaceae</i>	Acetyl
<i>Sporichthyaceae</i>	Acetyl
<i>Streptomycetaceae</i>	Acetyl
<i>Streptsporangiaceae</i>	Acetyl
<i>Thermomonosporaceae</i>	Acetyl

2.2.2.3 น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar)

องค์ประกอบของน้ำตาลเป็นข้อมูลที่มีถูกนำไปใช้ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแอคติโนมัยสีท สามารถตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์จะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบภายในเซลล์ รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่พบสามารถช่วยในการจำแนกลักษณะทางเคมี ของผนังเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 รูปแบบของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการอากาศซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโนพิเมติกแบบ *meso*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

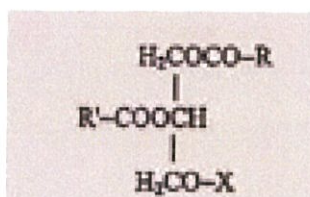
2.2.2.4 ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipia)

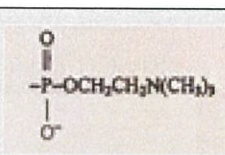
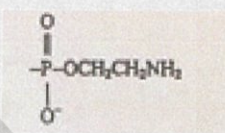
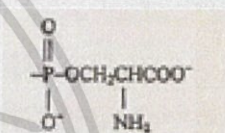
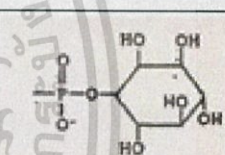
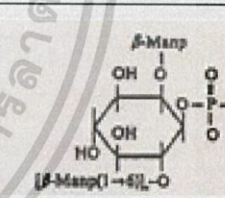
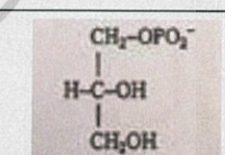
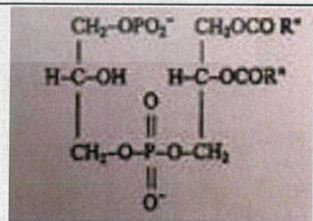
ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ฟอสโฟลิปิดมีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) โครงสร้างพื้นฐานและคำย่อของฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรียแสดงไว้ในตารางที่ 2.7 การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดนิยมทำโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ดีเวลอปแบบ 2 ทิศทาง (two-dimention) ซึ่งจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ตรวจพบจะจำเพาะกับรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ โดยชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบสามารถใช้ในการจัดระบบ (systematics) ของแบคทีเรียได้ Leehevalier และ คณะ (1981) ได้จัดรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.8

2.2.2.5 กรดไขมันในเซลล์ (cellular fatty acid)

กรดไขมันเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก คือ ปลายข้างหนึ่ง (hydrophilic head) ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้และปลายอีกข้างหนึ่ง (hydrophobic tail) ประกอบด้วย กรดไขมัน 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ประเภทของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เยื่อหุ้มเซลล์ของแอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดของกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบของกรดไขมันที่พบสามารถใช้ในการจัดระบบของเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ สามารถแยกกรดไขมันที่พบในเซลล์ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) และวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันเทียบกับฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI)

ตารางที่ 2.8 ฟอสโฟลิปิดที่พบในเซลล์แบคทีเรีย



ชนิดของฟอสโฟลิปิด	ตัวย่อ	X
Phosphatidylcholine	PC	
Phosphatidylethanolamine	PE	
Phosphatidylserine	PS	
Phosphatidylinositol	PI	
Phosphatidylinositolmannosides	PIMs	
Phosphatidylglycerol	PG	
Diphosphatidylglycerol	DPG	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 รูปแบบของฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีท

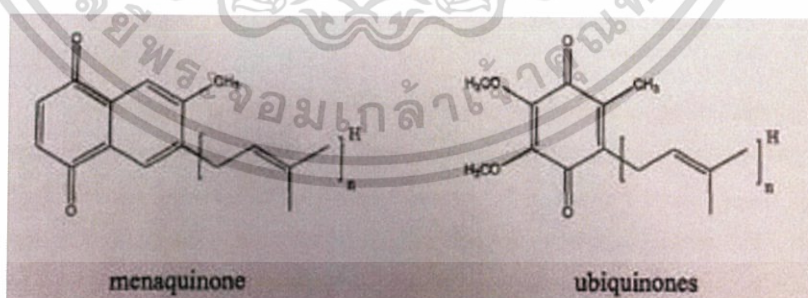
Phospholipid pattern	PE and its derivatives	PC	GlUNU
PI	-	-	-
PII	+	-	-
PIII	V	+	-
PIV	+	-	+

GlUNU คือ glucosamine containing phospholipid

V คือ variation

2.2.2.6 ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่พบได้มากที่สุด คือ มีนาควิโนน (menaquinones) และยูบิควิโนน (ubiquinones) (รูปที่ 2.7) ชนิดของควิโนนและจำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene unit) ในสายโซ่ และระดับของการเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในหน่วยไอโซพรีน ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย การตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนนและปริมาณหน่วยของไอโซพรีนทำได้โดยใช้เครื่องมือสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry, MS) และพบว่า การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin-layer chromatography) สามารถวิเคราะห์ควิโนนได้อย่างรวดเร็ว และเครื่องโครโมโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยังใช้แยกและตรวจสอบองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อย รวมทั้งยังใช้สำหรับการวิเคราะห์ควิโนนในเชิงปริมาณได้



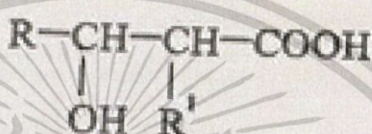
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของไอโซพรีนอยด์ควิโนนที่พบบ่อยในเซลล์แบคทีเรีย n คือ จำนวนหน่วยของไอโซพรีน

H คือ จำนวนอะตอมไฮโดรเจนที่เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันในพันธะคู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.7 กรดมัยคอลลิก (mycolic acid)

กรดมัยคอลลิก คือ กรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (2-alkyl-3-hydroxy fatty acids) (รูปที่ 2.8) ประกอบด้วยคาร์บอน 24-90 อะตอม มักพบในสกุล *Mycobacterium* *Nocardia* *Rhodococcus* และ *Corynebacterium* กรดมัยคอลลิกจะพบอยู่ในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์ชนิดที่ IV (มีไอโซเมอร์ของกรดไโตอะมิโนฟิสิกเป็นแบบ *meso* ที่ผนังเซลล์ และมีน้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตสภายในเซลล์) กรดมัยคอลลิกสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ กรดมัยคอลลิกที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น ไกลโคลิพิด (glycolipids) ฟีนอลิกไกลโคลิพิด (phenolic glycolipids) หรือไกลเปปติโดลิพิด (glycopeptidohipids)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของกรดมัยคอลลิก

R คือ คาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

R' คือ หมู่แอลคิล

2.2.3 ลักษณะทางจีโนมไทป์

ข้อมูลในสารพันธุกรรม (DNA) มีความสำคัญต่อการศึกษาการจัดระบบ (systemetic) ของเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างมาก การศึกษาระบบของแบคทีเรียมักนิยมศึกษาข้อมูลของ 16S rRNA gene บนสายดีเอ็นเอ เพื่อสืบหาสายวิวัฒนาการของเชื้อโดยการวิเคราะห์จากต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction: PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเวลาอันสั้น อาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอไรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น โดยอาศัยต้นแบบสายสั้นๆ ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) และคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้มากกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสให้สูงต่ำตามความต้องการ โดยที่ไม่ทำให้เอนไซม์นี้เสียความสามารถในการทำงาน

2.3 งานวิจัยที่สนับสนุนและเกี่ยวข้อง

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในคลาส (Class) Actinobacteria ในซับคลาส (Subclass) Actinobacteridae และถูกจัดไว้อยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 40 แฟมิลี และมากกว่า 200 สกุล (Euzby, 1998) เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณกวานีนและไซโทซีนในจีโนมอยู่ในช่วง 55-78 (Williams *et al.*, 1989)

แอกติโนมัยซีทมีรูปร่างที่หลากหลาย คือมีรูปร่างตั้งแต่ทรงกลมไปจนถึงรูปท่อน หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีรูปร่างเป็นเส้นสายที่แตกแขนงหรือหักเป็นท่อน สมาชิกส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ยกเว้น *Sporichthya* ที่สร้างเฉพาะเส้นใยอากาศ (Lechevalier and Pine, 1974)

แอกติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (sporangia)

สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทตามรูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ (Miyadoh, 1997) คือ

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์
4. กลุ่มที่สร้างสปอร์นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด

เส้นใยอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง และเจริญฝังแน่นลงในเนื้อวุ้น ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอกติโนมัยซีทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบนในระยะเริ่มแรกเส้นใยอากาศมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (Williams *et al.*, 1989) สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมีตั้งแต่สีขาว สีนํ้าตาล สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีดำ สีเทา สีม่วง สีแดง เป็นต้น บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหารและมีสีต่างๆ กัน เช่น สีเหลือง สีส้ม สีเทา สีนํ้าตาล สีชมพู เป็นต้น

เส้นใยที่แตกกิ่งก้านสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากเลี้ยงผ่านไป 24 ชั่วโมง และจะเห็นเป็นโคโลนีในวันที่ 3-4 ของการเจริญ ในขณะที่เส้นใยอากาศจะใช้เวลา 7-14 วัน จึงจะเจริญเต็มที่ และในบางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน แอกติโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลวมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มก้อน (pellet) เนื่องจากการรอกของสปอร์ และการพันกันแน่นของเส้นใย (Williams *et al.*, 1989)

แอกติโนมัยซีทมีค่า generation time ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เจริญได้ในอาหารที่มีค่า a (water activity) เท่ากับ 1.5-2.0 เเปอร์เซ็นต์ (w/v) และอาจมากถึง 3.0 เเปอร์เซ็นต์ในบางสกุล เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส (Williams *et al.*, 1989) แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-65 องศาเซลเซียส เช่น ในดินปุ๋ย คอกและปุ๋ยหมัก (Cross, 1968)

Chaisaeng S. (2013) ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากพืชสมุนไพร 4 ชนิด โดยวิธีการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว (surface sterile) และแยกเชื้อบนอาหาร Humic-acid vitamin (HV) agar ได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบ พบว่ามี 14 ไอโซเลทที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ทั้งแบคทีเรียแกรม บวก (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* และ *Serratia marcescens*) และยีสต์ (*Candida albicans*) โดยไอโซเลท BO-03, BO-07, BO-08 และ AL-03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดทำ การสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งสี่ไอโซเลท ด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและมีความสามารถในการต้านสารอนุมูล อิอิสระ นำสารสกัดหยาบนั้นมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทดสอบการต้านเซลล์มะเร็ง HeLa, HepG2 และ Huh 7 และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ด้วยวิธี MTT assay และนำสารสกัดหยาบ BO-07 มาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ด้วยวิธี Bioautography สามารถต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ทำการจัดจำแนกเชื้อ แอกติโนมัยซีทไอโซเลท BO-07 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบก้านขุสปอร์เป็นสายเดี่ยว สปอร์รูปไข่ ผิวเรียบต่อกันเป็นสายยาวโค้งและจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยการไอโดไรลซ์ เซลล์พบ 2,6 diaminopimelic acid (DAP) ชนิด LL-diaminopimelic acid เมื่อนำมาศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเชื้อ BO-07 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจากการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีต้นไม้วัดขนาดการของ 16S rDNA พบว่าเชื้อ BO-07 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces daghestanicus* ถึง 99.73%

Chanaphant S. (2010) ทำการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด โดยวิธี surface sterilized ได้ 52 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC6633, *Candida albicans* ATCC90028, *Escherichia coli* ATCC10536, *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. และ *Sclerotium rolfsii* พบว่ามีเพียง 16 ไอโซเลทเท่านั้นที่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยไอโซเลท TL-19 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดจากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ TL-19 พบก้านชูสปอร์เป็นสายเดี่ยวสร้างสปอร์รูปไข่ผิวเรียบต่อกันเป็นสายยาวโค้ง เมื่อนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเชื้อ TL-19 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจากการทำ phylogenetic tree ของ 16S rDNA พบว่า เชื้อ TL-19 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces caviscabies* ATCC 51928T และ *Streptomyces setonii* ATCC 25497T ถึง 99% และจากการศึกษา chemotaxonomy พบว่า whole cell hydrolysates ของเชื้อ TL-19 มี 2,6 diaminopimelic acid (DAP) ชนิด LL-DAP จึงสรุปได้ว่า *Streptomyces* sp. TL-19 เป็นเชื้อที่แยกได้จากใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จาก *Streptomyces* sp. TL-19 มาศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ Human keratinocyte และ L929 ตรวจสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay นำสารสกัดหยาบมาศึกษาการรอกของสปอร์เชื้อราทดสอบพบว่า การรอกของสปอร์เชื้อราทดสอบจะลดลงเมื่อสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น นำสารสกัดหยาบมาทดสอบความสามารถในการป้องกันโรคแอนแทรกซ์ในพริกแดงและมะเขือเทศพบว่าสามารถป้องกันโรคได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินโครงการงานพิเศษ

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแอกติโนมัยสีท

ทำการเก็บรักษาเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์ (pure culture) ลงในหลอดอาหารเอียง (slant) ยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลต์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract – malt extract agar) หรืออาหารสูตรตัดแปลงซอเย็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar) โดยการเลือกใช้อาหารขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้งานในช่วงเวลาสั้นๆ ทำการเก็บรักษาเชื้อเพื่อให้ใช้งานได้เป็นเวลาหลายปี โดยนำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความบริสุทธิ์มาเลี้ยงลงอาหารสูตรตัดแปลงซอเย็กแทรกท์ เอการ์ (soil extract agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ตัดชั้นวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อที่เจริญอยู่เก็บลงในหลอดที่มีสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และทำการตรวจความมีชีวิตรอดของเชื้อทุกปี (เชื้อได้จากนางสาวนันท์วัน เนียมหอม นักศึกษาชั้นปริญญาเอกปัจจุบัน คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

3.2.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทลงบนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-28 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ ตรวจสอบลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

3.2.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากโดยการเลี้ยงลงบนอาหารกลูโคส แอสพาราจีน เอการ์ (glucose asparagines agar) (ภาคผนวก ก) อาหารซาเป็กซูโครส เอการ์ (czapek's sucrose agar) (ภาคผนวก ก) และอาหารต่างๆ ตาม International Streptomyces Project (ISP) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลต์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) อาหารโอทมีล เอการ์ (oatmeal agar, ISP3) (ภาคผนวก ก) อาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salt-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอการ์ (glycerol-asparagine agar, ISP5) (ภาคผนวก ก) อาหารเปปโตเน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอการ์ (peptone-asparagine extract iron agar, ISP6) (ภาคผนวก ก) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) (ภาคผนวก ก) โดยการทำให้เป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) หรือสารละลายเซลล์ (cell suspension) แล้วหยดลงบนอาหารต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับการดาซสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system) (Kelly, 1964)

3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

3.2.1.3.1 การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอลเอการ์ (basal agar medium, ISP9) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบกับชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

- (1) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)
- (2) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ แต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นปานกลาง (±)
- (3) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกเป็นลบ (-)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลเด็กแทรน (Dextran) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลดี-ฟรุคโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-รามโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลไซลิตอล (Xylitol) น้ำตาลดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) น้ำตาลแลกโตส (lactose) น้ำตาลเมลิซิโตส (Melezitose) กลีเซอรอล (glycerol) น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol) น้ำตาลอะโดนิทอล (Adonitol) และน้ำตาลทรีฮาโรส (Trehalose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.3.2 ความสามารถในการย่อยสลายแป้ง (starch hydrolysis)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในอาหารอินออร์แกนิก ซอลท์-สตาร์ช เอการ์ (inorganic salt – starch agar, ISP4) (ภาคผนวก ก) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำสายละลายไอโอดีนลาดลงบนผิวอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.2.1.3.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารบูลลิลลอน เจลาติน (bouillon gelatin broth) (ภาคผนวก ก) (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจสอบผลโดยการนำหลอดอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว

3.2.1.3.4 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

นำสายละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวเปปโตโนโทแทสซีเอ็มไนเตรต (peptone KNO₃) (ภาคผนวก ก) (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยดกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ปริมาตร 2 หยด (ภาคผนวก ข) และสารละลายไดเมทิลเนปทิลลามีน (*N,N*-dimethyl-*l*-naphthylamine) ปริมาตร 3 หยด (ภาคผนวก ข) หากมีการเปลี่ยนรูปไนเตรตเป็นไนไตรต์ สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

3.2.1.3.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

(1) นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารเหลวสกีมมิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้ อาหารจะมีลักษณะใส

(2) นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดอาหารแข็งสกีมมิลค์ (skim milk) (ภาคผนวก ก) (Gordon และคณะ, 1974) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้ จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

3.2.1.3.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำสายละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 2 3 4 5 6 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อ (Gordon และคณะ, 1974)

3.2.1.3.7 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 20 30 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อ (Gordon และคณะ, 1974)

3.2.1.3.8 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ปริมาตร 400 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเหลวยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ (yeast extract-malt extract broth, ISP2) ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 (ภาคผนวก ข) เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อ (Gordon และคณะ, 1974)

3.2.1.3.9 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต (acid production from carbohydrates)

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเบซอลอินออร์แกนิกไนโตรเจน (basal inorganic nitrogen) (ภาคผนวก ก) (Gordon และคณะ, 1974) ที่เติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบ โดยหากเชื้อสามารถสร้างกรดได้ อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) น้ำตาลดี-ทรีฮาโลส (D-trehalose) น้ำตาลดี-ไรโบส (D-Ribose) น้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) น้ำตาลดี-เมลิซิทอล (D-Melezitose) น้ำตาลดี-กาแลกโตส (D-galactose) น้ำตาลเด็กแทรน (Dextran) น้ำตาลอะโดนิ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทอล (Adonitol) น้ำตาลดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) น้ำตาลเมลิไบโอส (Melibiose) น้ำตาลดี-ฟรุกโตส (D-fructose) น้ำตาลแอล-รามโนส (L-rhamnose) น้ำตาลดี-ซูโครส (D-sucrose) น้ำตาลแลคโตส (lactose) กลีเซอรอล (glycerol) น้ำตาลดี-แมนนิทอล (D-mannitol) และน้ำตาลไซลิตอล (Xylitol)

3.2.1.3.10 การใช้แหล่งของไนโตรเจน

ตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งของไนโตรเจน โดยเติมแหล่งของไนโตรเจนลงใน basal medium ที่ประกอบด้วย glucose (1.0 % น้ำหนัก/ปริมาตร) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05% น้ำหนัก/ปริมาตร) NaCl (0.05% น้ำหนัก/ปริมาตร) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.001% น้ำหนัก/ปริมาตร) K_2HPO_4 (0.1% น้ำหนัก/ปริมาตร) และ agar (1.2% น้ำหนัก/ปริมาตร) สังเกตผลหลังบ่มเชื้อไว้ 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมแหล่งของไนโตรเจนเป็นชุดควบคุมเชิงลบ และอาหารที่เติม L-asparagine หรือ L-serine เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (Thawai, C.2005)

โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

- (1) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นบวก (+)
- (2) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ แต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก ให้บันทึกผลเป็นปานกลาง (±)
- (3) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบ ให้บันทึกเป็นลบ (-)

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดสอบ คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenyl alanine) โพรลีน (Proline) ไฮดรอกซี โพรลีน (Hydroxy proline) วาลีน (Valine) ฮีสทิดีน (Histidine) อะมิโนบิวทาริก (Aminobutanic) อาร์จินีน (Arginine) ซีสทีน (Cystein) ทีโอนีน (Theonine) และเมไทโอนีน (Methionine)

3.2.1.3.11 การวิเคราะห์ยูเรีย

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารผสมระหว่าง urease broth กับ urease solution และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากผลเป็นบวก สีของอาหารจะมีการเปลี่ยนเป็นสีชมพู (Thawai, C.2005)

3.2.1.3.12 การย่อย Insoluble compound

นำสารละลายสปอร์หรือสารละลายเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร ISP2 ที่เติมสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ (Tyrosine , Hypoxanthin ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xanthin , adenine , cellulose) บ่มที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (Thawai, C.2005)

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางเคมีโทป์

3.2.1.1 การเตรียมเซลล์แห้ง

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลว YD Broth (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) จากนั้นเก็บรักษาเซลล์แห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป (Komagata และ Suzuki, 1987)

3.2.1.2 การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมลิกที่ผนังเซลล์

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 10 มิลลิกรัมลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้เย็น กรองแล้วนำส่วนใสที่ได้ ไปทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสภาวะสุญญากาศ ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ และสารละลายมาตรฐาน (2,6-DAP คือ *meso*-DAP และ *LL*-DAP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จุดลงบนแผ่น HPLC cellulose (Merck, no.5716) ขนาด 10x10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของ methanol : water : 6N HCL : pyridine อัตราส่วน 40 : 13 : 2 : 5 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิลิตร) รอให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบสมร้อน ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจแถบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับแถบของสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพิมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ (Komagata และ Suzuki, 1987)

3.2.1.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติม 1N กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเติมสารละลายอิมตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ จนมีค่า pH ที่ 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้เติม ethanol 1-2 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟองระเหยให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร เกล็ดสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) ไปจุดลงบนแผ่น HPLC cellulose (Merck, no. 5716) ขนาด 10x10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสมของ n-butanol : water : toluene : pyridine อัตราส่วน 20 : 12 : 12 : 2 ทั้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้ง develop ซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่นด้วยสารละลาย aniline phthalate รอให้แห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบจุดที่เกิดขึ้นเทียบกับ สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน บริเวณที่ปรากฏแถบสีของน้ำตาลมาตรฐานมี 2 แบบคือ น้ำตาลที่มี จำนวนคาร์บอน 5 อะตอม จะให้แถบสีชมพู ได้แก่ น้ำตาลไรโบส น้ำตาลไซโลส และ น้ำตาลอะราบี โนส ส่วนน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอม จะให้แถบสีเหลือง ได้แก่ น้ำตาลแรมโนส น้ำตาลแมน โนส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกาแลคโตส (Komagata และ Suzuki, 1987)

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น 2 กลุ่ม คือ
 กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแรมโนส
 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบีโนส และน้ำตาลไรโบส

3.2.1.4 การวิเคราะห์ไขมันชนิดมีขี้

ชั่งเซลล์แห้งหนัก 150 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ methanol : 0.3% NaCl อัตราส่วน 100 : 10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ petroleum ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมนิโตรเลียม อีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม สารละลายผสมของ chloroform : methanol : water อัตราส่วน 27 : 30 : 9 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายผสมของ chloroform : methanol : water อัตราส่วน 15 : 30 : 12 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม ผสมให้เข้ากันเป็น เวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสไปรวมใน หลอดทดลองใหม่ข้างต้น ทำการสกัดอีกครั้ง เติม chloroform ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร และน้ำ ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วนำสารสกัดส่วนล่างไป เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายสารตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วย chloroform : methanol อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น silica TLC (Merck 60 F₂₅₄, 10x10 cm) ทำจำนวน 5 แผ่น นำแผ่น TLC ที่ได้มาทำการ develop

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ทิศทาง (Two-dimensional development) ในระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยจุ่มแผ่น TLC ลงในตัวทำละลายผสมของ chloroform : methanol : water อัตราส่วน 65 : 25 : 4 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้ง จากนั้นจุ่มแผ่น TLC แผ่นเดิมลงในตัวทำละลายผสมของ chloroform : acetic acid : methanol : water อัตราส่วน 80 : 15 : 12 : 4 โดยกลับด้าน TLC ในทิศทางที่ตั้งฉากกับแนวเดิม ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้ง แล้วนำไปฉีดพ่นด้วย reagent ชนิดต่างๆ (Minnikin et al., 1984) ดังนี้

1. ฉีดพ่นด้วย Dittmer & Lester reagent แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ phospholipid ทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)
2. ฉีดพ่นด้วย Ninhydrin reagent รอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับวิเคราะห์ phosphatidylethanolamine, methylphosphatidylethanolamine และ OH-phosphatidylethanolamine (จุดสีชมพู)
3. ฉีดพ่นด้วย Anisaldehyde reagent รอให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้สำหรับวิเคราะห์ไกลโคลิปิด (จุดสีเขียวอมเหลือง) และลิปิดอื่นๆ (จุดสีน้ำเงิน)
4. ฉีดพ่นด้วย Dragendorff reagent แล้วรอให้แห้ง สำหรับวิเคราะห์ phosphatidylcholine (จุดสีส้ม)
5. ฉีดพ่นด้วย Phosphomolybdic reagent (จุดสีน้ำเงิน)

3.2.1.5. การวิเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ควิโนน

ซึ่งเซลล์แห้งหนัก 100 ถึง 500 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ฟลาเกลียว เต็มตัวทำละลายผสมของ chloroform : methanol ในอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 20 มิลลิเมตร ปิดฝาให้แน่น หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน กรองเซลล์ออกโดยใช้กระดาษกรอง whatman no.1 นำส่วนใสที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส ละลายด้วย acetone ปริมาตร 1 มิลลิเมตร ดูดสารที่ละลายในอะซิโตนมาจุดลงบนแผ่น silica gel TLC (Merck 60 F₂₅₄, 20x20 cm) โดยจุดเป็นแถบยาว นำแผ่น TLC ที่ได้ไปจุ่มในตัวทำละลาย benzene 100% ตรวจสอบแถบ menaquinone โดยส่องดูภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ดินสอดำวงบริเวณที่ปรากฏแถบของ menaquinone แล้วจุด silica gel ใส่ลงในหลอดทดลองละลายด้วย acetone ปริมาตร 1 มิลลิเมตร กรองและเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย acetone ในปริมาณเล็กน้อย ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ODS reverse phase silica gel ใช้ตัวทำละลายผสมของ methanol : 2-propanol อัตราส่วน 2 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้อัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (Komagata และ Suzuki, 1987)

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

3.2.2.1 การแยกดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) 1 ครั้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isomyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยมือเป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate) ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเติมเอทานอลแช่เย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้งแล้วนำไปละลายในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร (Yukphan, 2006)

3.2.2.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ ปราศจากอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดยเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอส ที1 (RNase T1) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในดีเอ็นเอซึ่งละลายในสารละลายซาไลน์-โซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 1 เท่า (1x saline-sodium citrate, 1xSSC) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมง เติมสารละลายเอนไซม์โปรตีนเนส เค (Proteinase K) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้แล้ว แล้วเติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้งแล้วนำไปละลายในสารละลายซาลีน-โซเดียมซิเตรต ความเข้มข้น 1 เท่า (Yukphan, 2006) ทำซ้ำเช่นเดิมอีก 1-2 ครั้ง

3.2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตรดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคิล (thermal cycler) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ตั้งไว้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงในตารางที่ 3.2 (Yukphan และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 20F*	10 pmol/ μ l	4.0 μ l
Primer : 1500R*	10 pmol/ μ l	4.0 μ l
Dntp	2.0 mM	10.0 μ l
10X <i>Taq</i> buffer	10X	10.0 μ l
MgCl ₂	25.0mM	8.0 μ l
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5Unit/ μ l	0.5 μ l
Milli Q water		59.5 μ l
Template DNA	100-200 ng/ μ l	4.0 μ l
รวม		100.0 μ l

*primer : 2F (5'GAG TTT GAT CCT GCT CAG 3')

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Denaturation step
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซลเซียส	1 นาที		Annealing step
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		Extension step
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	
รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที			

3.2.2.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ของบริษัท Geneaid ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PB solution ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง เติมห้างล้าง buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เติมห้างล้าง EB buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.2.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.4 (Yukphan และคณะ, 2005)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

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

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

800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T

520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG

1492 : TAC CAG GGT ATC TAA TCC

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม BIG dye

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

3.2.2.6 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

ทำการจัดเรียง(alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก(selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.7 package (www.megasoftware.net/) (Yukphan และคณะ, 2005)

3.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดผลผลิตและการสกัดสาร

นำเชื้อแอสกีโนมัยซีที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวยีสต์เอ็กแทรกท์- มอลท์เอ็กแทรกท์ (yeast extract – malt extract broth) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) แล้วนำไประเหยให้แห้ง โดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี agar disc diffusion (Lorian, 1980)

ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 7 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้ไม้ปั่นสำลีป้ายเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบผสมลงในหลอดน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) ผสมให้เข้ากัน ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับแม็คฟาร์แลนด์เบอร์ 0.5 (McFarland no.0.5) ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร ใช้ไม้ปั่นสำลีทาเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารทริปติก ซอย เอการ์ (tryptic soy agar) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud dextrose agar สำหรับยีสต์ เป็นแนวระนาบ 3 จำนวนระนาบ จากนั้นนำแผ่นดิสก์ ซึ่งหยดสารละลายของสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นดิสก์ ทิ้งให้แห้ง แล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่ทาเชื้อทดสอบ ทำชุด negative control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด และชุด positive control โดยการใช้แผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะสำหรับเชื้อทดสอบนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย ได้แก่ กะลา กระเจียวขาว และเปราะราศรี จากส่วนของรากและใบ นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสัท พบว่าได้เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัทที่คาดว่า จะเป็นเชื้อชนิดใหม่ นำมาศึกษาทั้งหมด 3 ไอโซเลต (เชื้อได้จากนางสาวนันทวัน เนียมหอม นักศึกษา ชั้นปริญญาเอกปัจจุบัน คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของพืชตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสัทที่แยกได้

ชนิดของพืช		ส่วนของพืช	รหัสเชื้อ
ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์		
กะลา	<i>Alpinia nigra</i>	ราก	AN1-29
กระเจียวขาว	<i>Curcuma parriflora</i>	ใบ	CP1-1
เปราะราศรี	<i>Kaempferia larsenii</i>	ใบ	KK1-2

โดยพืชสมุนไพรไทยที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่มีการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสัทหรือยัง ไม่มีผู้ใดนำมาศึกษา จึงยกตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการระบุชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสัทจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นมาสนับสนุน ได้แก่

Li et al. (2013) พบเชื้อ *Streptomyces endophyticus* ที่แยกจาก *Artemisia annua* L.

Qin et al. (2013) พบเชื้อ *Streptomyces halophytocola* ที่แยกจากบริเวณลำต้นของ *Tamarix chinensis* Lour.

Tanasupawat et al. (2016) พบเชื้อ *Streptomyces phyllanthi* ที่แยกจากลำต้นของ *Phyllanthus amarus*

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

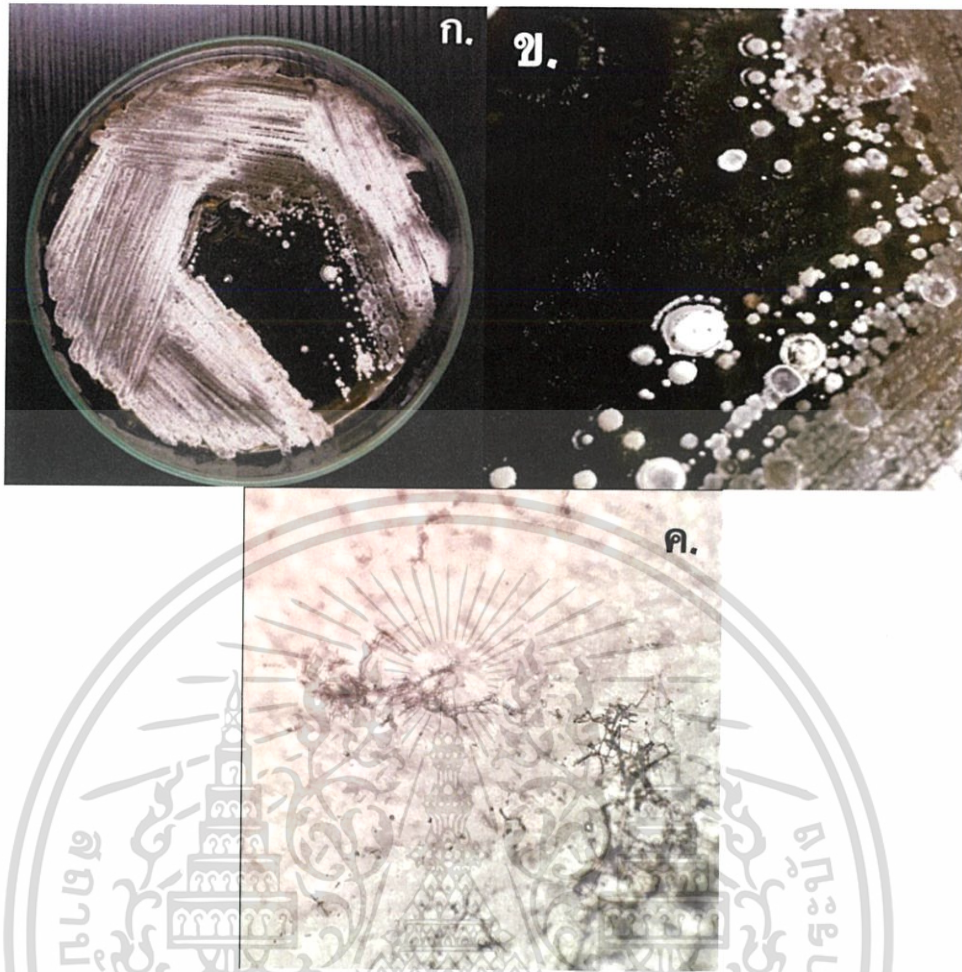
ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ได้เลือกนำมาศึกษาทั้ง 3 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว (รูปที่ 4.1) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ISP3 ISP4 ISP6 และ Cz.sucrose มีสมาชิก 1 ไอโซเลต คือ AN1-29

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 6-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (ตารางที่ 4.3) และไม่มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



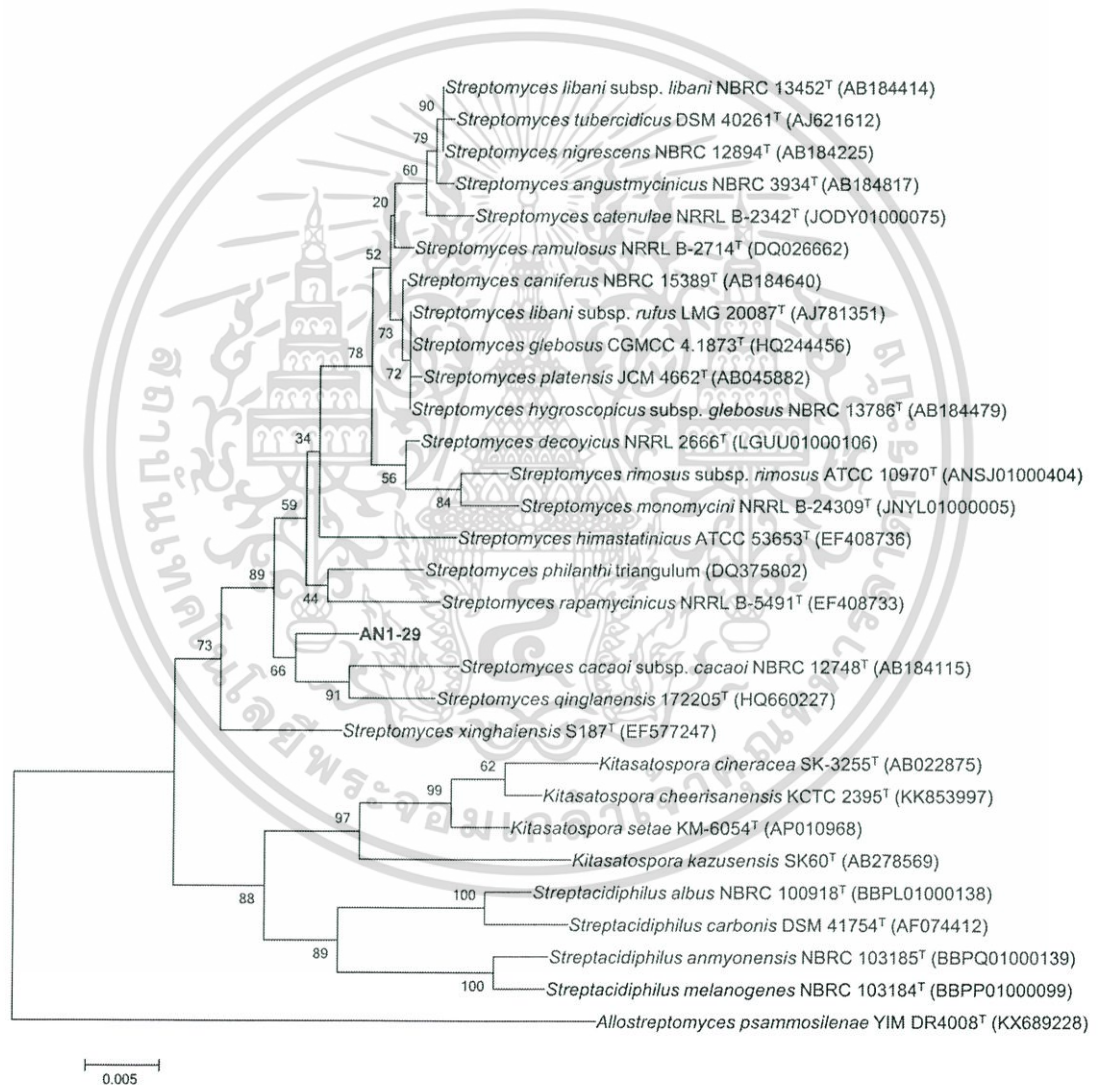
รูปที่ 4.1 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN1-29 บนอาหาร ISP2
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ AN1-29 ในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อ AN1-29 ประกอบด้วยกรดไดอะมีโนพิเมอิกแบบ LL พบน้ำตาลไรโบส อะลาปีโนส และกาแลคโตสเป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ พบ Diphosphatidylglycerol และ Phosphatidylethanolamine เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อ AN1-29 อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN1-29

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN1-29 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces glebosus* CGMCC 4.1873^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.40 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ohmori และคณะ ที่ทำการค้นพบเชื้อ *Streptomyces glebosus* CGMCC 4.1873^T ในปี 1962 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 66 กับเชื้อ *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi* NBRC 12748^T (Tian et al.,2009) และ *Streptomyces qinglanensis* 172205^T (Hu et al.,2012) (รูปที่ 4.2)

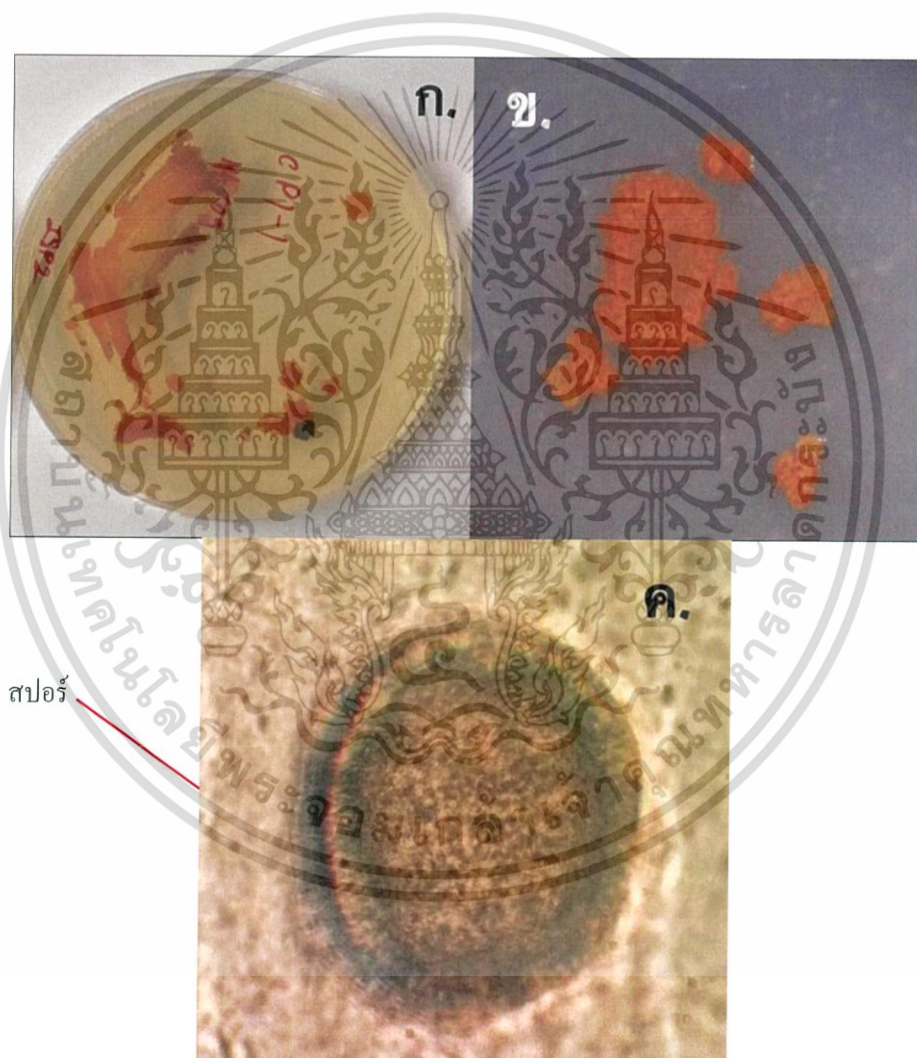


รูปที่ 4.2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN1-29 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำเมื่อสร้างสปอร์ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร ลักษณะสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยว เกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 4.3) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP3 และ ISP4 มีสมาชิก 1 ไอโซเลต คือ CP1-1

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 4-11 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (ตารางที่ 4.3) และไม่มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้



รูปที่ 4.3 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP1-1 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

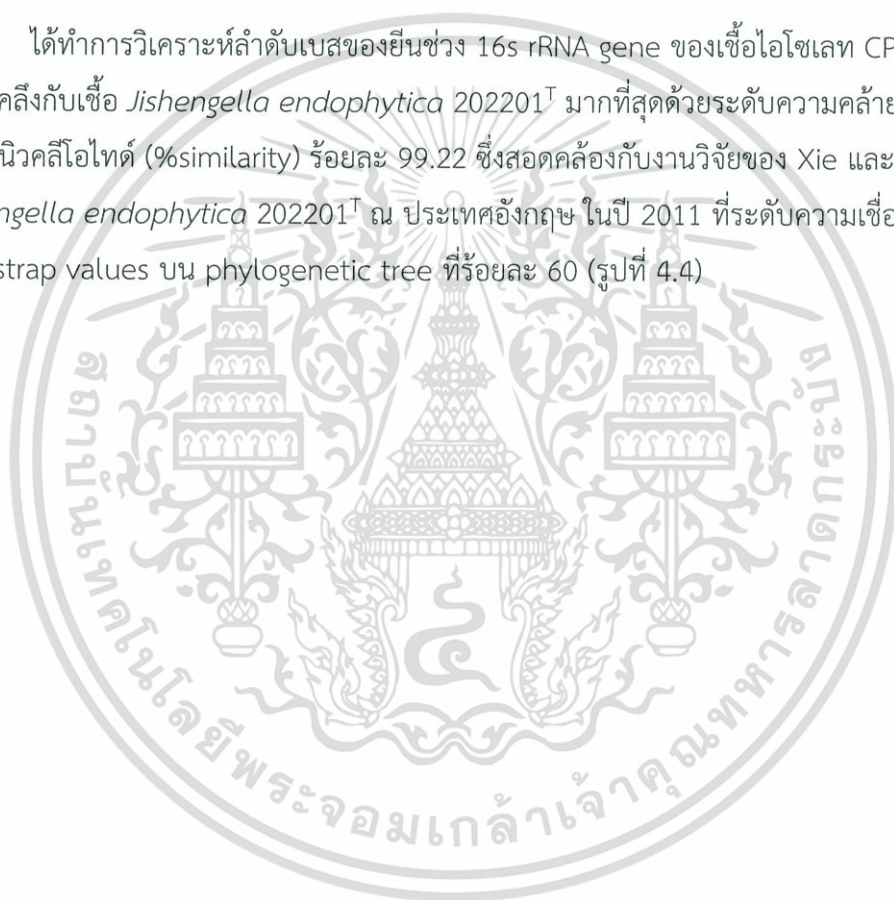
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

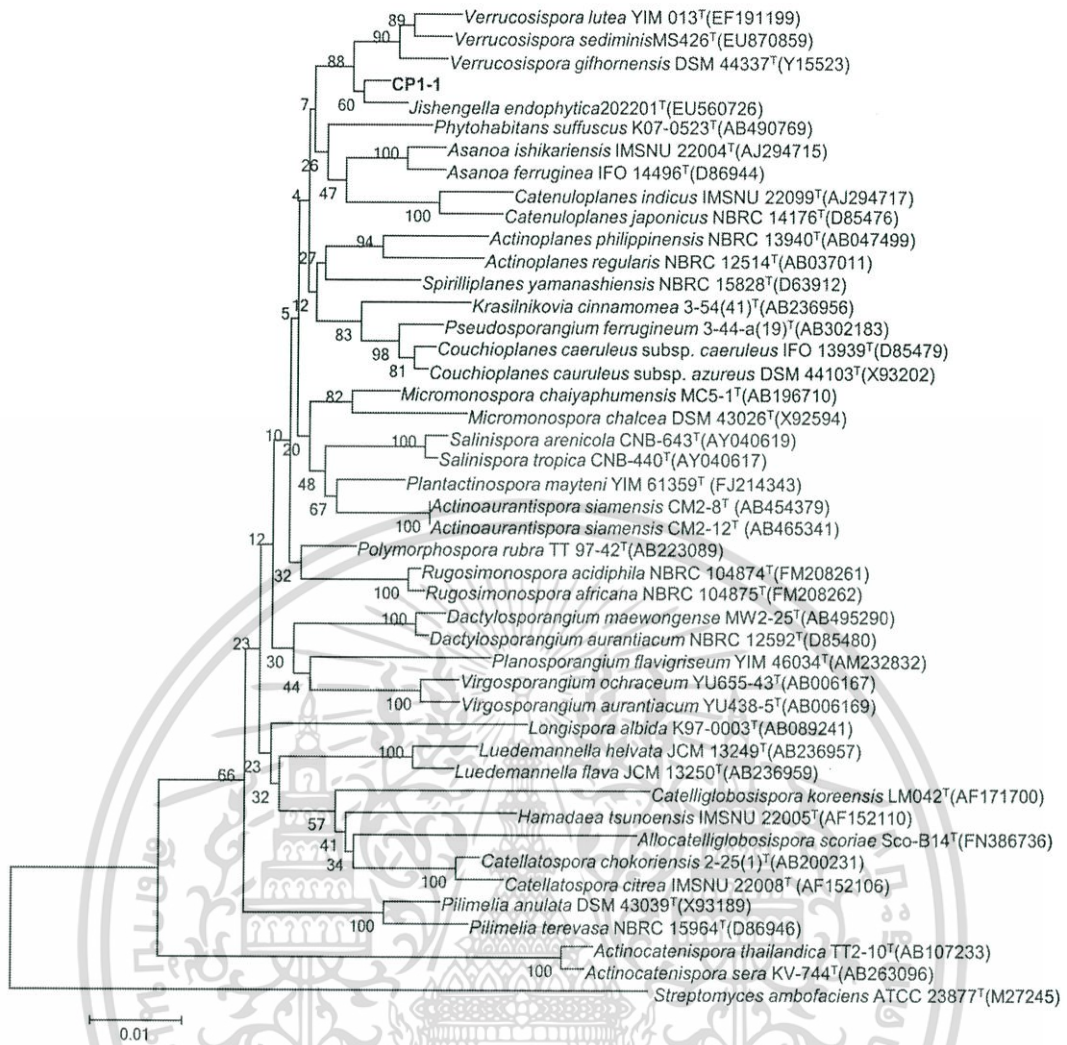
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ CP1-1 ในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อ CP1-1 ประกอบด้วยกรดไขมันพิวเมติกแบบ Meso และแบบ OH พบ น้ำตาลไรโบส อะลาบินโนส และกลูโคสเป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ Diphosphatidylglycerol Phosphatidylglycerol Phosphatidylethanolamine และ Phosphatidylinositol เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อ CP1-1 อยู่ในสกุล *Jishengella*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP1-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Jishengella endophytica* 202201^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.22 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie และคณะ ที่พบ *Jishengella endophytica* 202201^T ณ ประเทศอังกฤษ ในปี 2011 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 60 (รูปที่ 4.4)



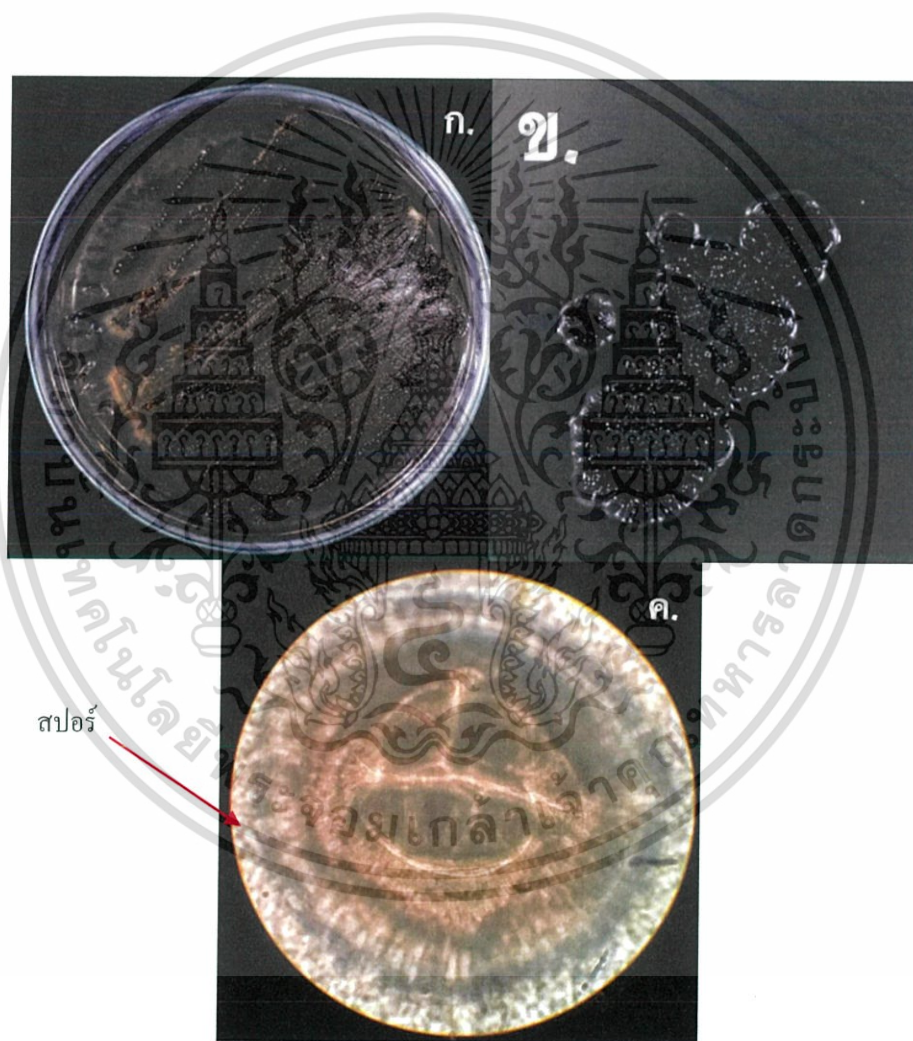


รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไฮโซเลต CP1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองแกมเขียวอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มอมดำเมื่อสร้างสปอร์ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร ลักษณะสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยว เกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 4.5) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 มีสมาชิก 1 ไอโซเลต คือ KK1-2

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 6-8 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (ตารางที่ 4.3) และไม่มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้



รูปที่ 4.5 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KK1-2 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

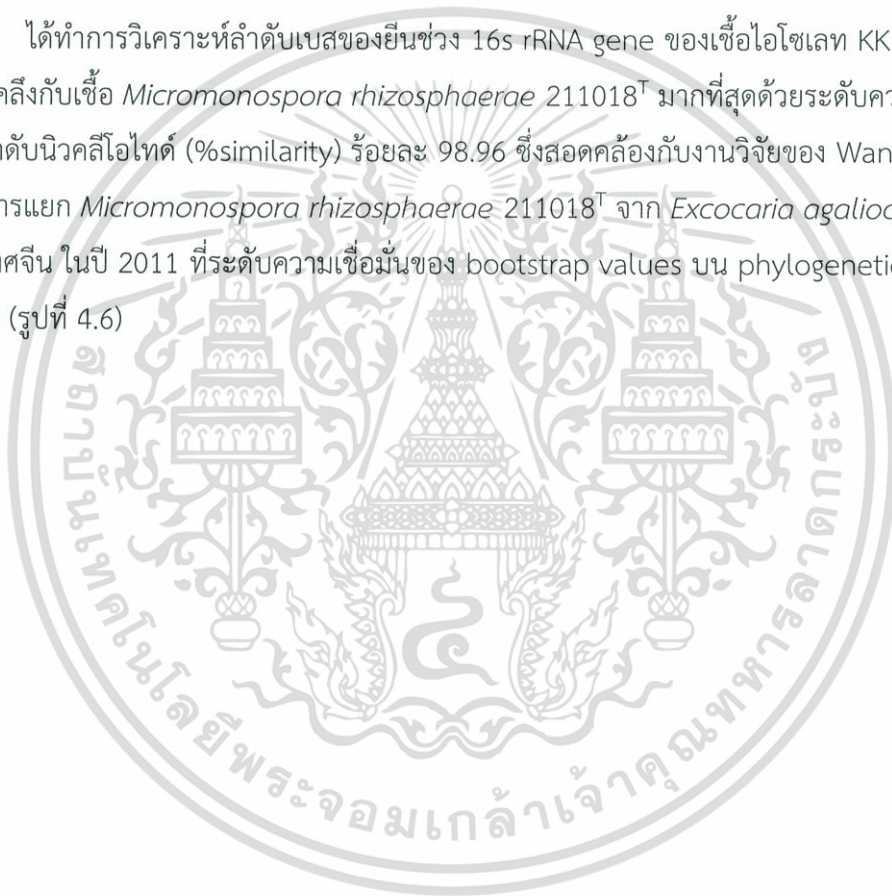
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

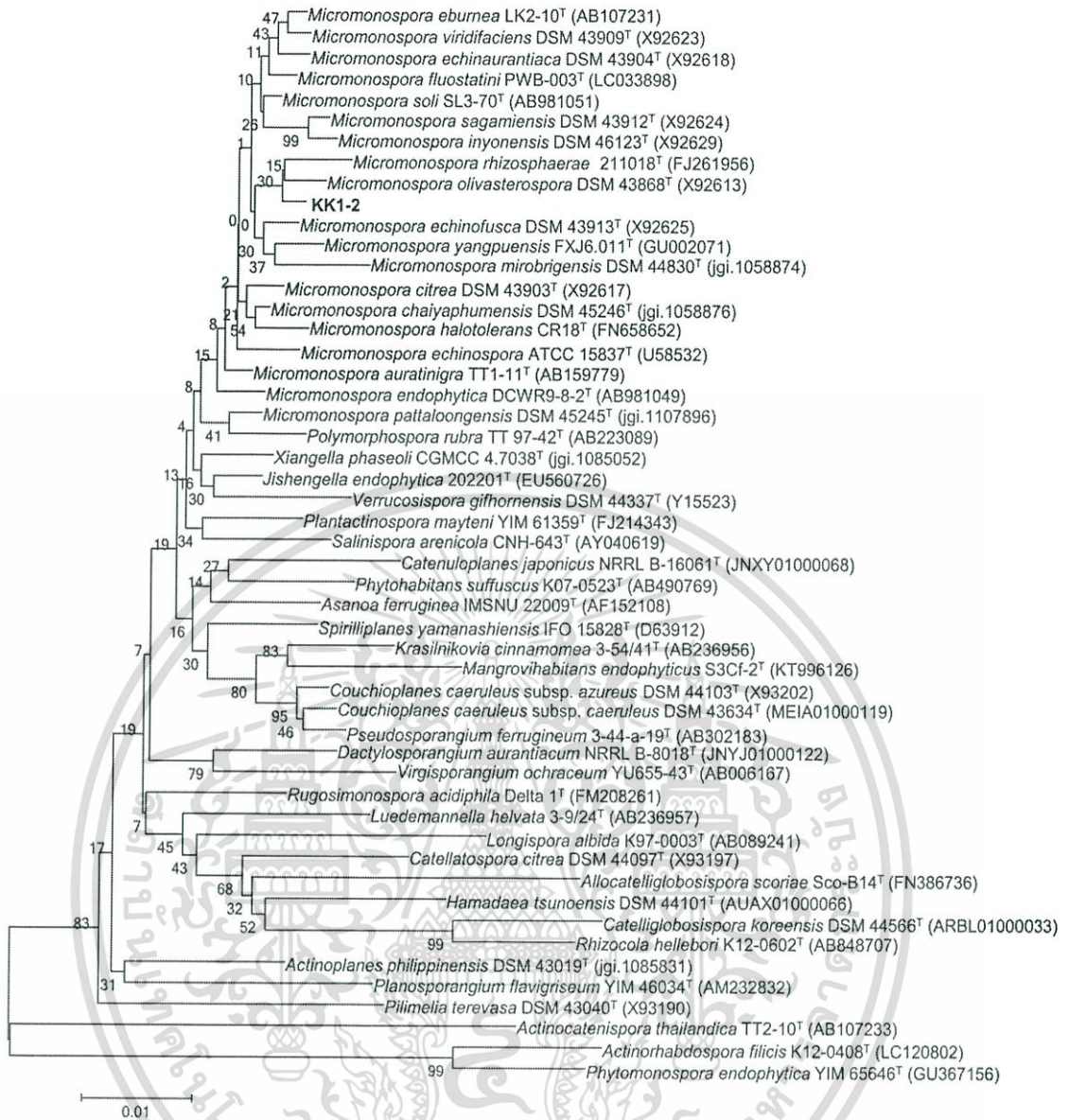
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ KK1-2 ในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อ KK1-2 ประกอบด้วยกรดไตรอะมิโนพิเมติกแบบ Meso พบน้ำตาลไรโบส ไฮโรส อะลาปีโนส และกลูโคสเป็นน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ Diposphatidylglycerol Phosphatidylglycerol Phosphatidylinositolmannosides Phosphatidylinositol และ Phosphatidylethanolamine เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อ KK1-2 อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KK1-2

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16s rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KK1-2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora rhizosphaerae* 211018^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.96 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ ที่ทำการแยก *Micromonospora rhizosphaerae* 211018^T จาก *Excocaria agaliocha* ณ ประเทศจีน ในปี 2011 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 30 (รูปที่ 4.6)





รูปที่ 4.6 แสดงตำแหน่งของเชื้อโคโนเลต KK1-2 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
AN1-29	ISP2	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP3	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP4	ดี	ขาว	เหลืองสว่าง	-
	ISP5	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อนแกมเขียว	-
	ISP6	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP7	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	ปานกลาง	-	ขาว	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
CP1-1	ISP2	ปานกลาง	-	ส้มเข้มอมเหลือง	-
	ISP3	ดี	-	ส้มสว่างอมเหลือง	-
	ISP4	ดี	-	ส้มเข้มอมเหลือง	-
	ISP5	น้อย	-	ส้มเข้มอมเหลือง	-
	ISP6	ปานกลาง	-	ส้มเข้มอมเหลือง	-
	ISP7	น้อย	-	ส้มเข้มอมเหลือง	-
	Glu.A.	ไม่เจริญ	-	-	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	-	ส้มสว่างอมเหลือง	-
KK1-2	ISP2	ดี	-	น้ำเงินเข้มอมดำ	-
	ISP3	ดี	-	เหลืองสว่างอมน้ำตาล	-
	ISP4	ปานกลาง	-	ฟ้าอ่อนมากๆ	-
	ISP5	ไม่เจริญ	-	-	-
	ISP6	ไม่เจริญ	-	-	-
	ISP7	ไม่เจริญ	-	-	-
	Glu.A.	น้อย	-	เขียวอ่อนแกมเหลือง	-
	Cz.sucrose	ไม่เจริญ	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปิซิฟิใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นเกลือ(ร้อยละ)							%ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ(°C)					
		1	1.5	2	3	4	5	6	7	4	5	6	7	8	9	10	11	12	20	30	37	40	45	50
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	+	+	+	±(+)	+	-	-	-	±	±	+	+	±	±	±	±	-	±	+	+	+	-	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	+	+	+	±(+)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

หมายเหตุ + = Positive reaction
 - = Negative reaction
 ± = Weakly reaction

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสัทยาที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปิซิสใหม่ (ต่อ)

สกุล	รหัสเชื้อ	การย่อยสารที่ไม่ละลายน้ำ					Skim milk		การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรท	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยยูเรีย
		Adenine	Cellulose	Hypoxanthine	Tyrosine	Xanthine	Peptonization	Coagulation				
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

หมายเหตุ + = Positive reaction
 - = Negative reaction
 ± = Weakly reaction

ตารางที่ 4.4 การใช้แหล่งพลังงานของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์บอน														
		Negative(-)	Glucose(+)	Adonitol	D-cellobiose	Dextran	D-fructose	Galactose	Glycerol	Lactose	Mannitol	D-melezitose	Melibiose	Rhamnose	Sucrose	D-trehalose
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	+	-	±	-	+	+	+	+	-	-	-	±	-	+

หมายเหตุ + = Positive reaction
 - = Negative reaction
 ± = Weakly reaction

ตารางที่ 4.4 การใช้แหล่งพลังงานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่(ต่อ)

สกุล	รหัสเชื้อ	แหล่งไนโตรเจน											
		Negative(-)	Asparagine(+)	Serine(+)	Aminobutanic	Arginine	Cystein	Histidine	Hydroxy proline	Methionine	Phenyl alanine	Proline	Theonine
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	±(+)	+
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	+	+	-	±	+	+	-	+	+	-	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	+	±	-	+	-	+	±(+)	+	+	-	-

หมายเหตุ

+ = Positive reaction

- = Negative reaction

± = Weakly reaction

ตารางที่ 4.5 การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตของเชื้อแอคติโนมัยส์สายพันธุ์หายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	แหล่งคาร์โบไฮเดรต																	
		Negative(-)	Glucose(+)	Adonitol	D-cellubiose	Dextran	D-fructose	Galactose	Glycerol	Lactose	Mannitol	D-melezitose	Melibiose	Rhamnose	Sucrose	D-trehalose	Xylitol	D-ribose	D-xylose
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	+	-	+	±	+	+	+	±		-	±	+	+	-	+	+	
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	+	-	±	-	+	-	-	+		-	-	+	+	+	+	+	
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	±(-)	-	+	±(-)	+	-	±(-)	+	+	±(-)	+	+	+	+	-	+	±(-)

หมายเหตุ + = Positive reaction
 - = Negative reaction
 ± = Weakly reaction

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมลิกที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปิซีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	ชนิดของไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพีเมลิก (Diaminopimelic acid type)		
		LL-DAP	Meso-DAP	OH-DAP
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	+	-	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	+	+
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	+	-

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปิซีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์							
		Rhamnose	Ribose	Xylose	Madurose	Mannose	Arabinose	Glucose	Galactose
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	+	+	-	-	+	+	-

ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบของไขมันชนิดมีขั้วของเชื้อแอสคิตินอมัยสียที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	ชนิดของโพลาลิปิด (polar lipid type)										
		DPG	PG	PIMs	PI	PE	PME	OH-PE	Lyso-PE	PS	PC	GluNu
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ DPG คือ diphosphatidylglycerol PG คือ phosphatidylglycerol PIMs คือ phosphatidylinositolmannosides PI คือ phosphatidylinositol PE คือ phosphatidylethanolamine PME คือ phosphatidylmonomethylethanolamine OH-PE คือ hydroxyl- phosphatidylethanolamine Lyso-PE คือ lyso phosphatidylethanolamine PS คือ phosphatidylserine PC คือ phosphatidylcholine GluNu คือ glucosamine containing phospholipids

ตารางที่ 4.9 ชนิดของเมนาควิโนน (menaquinone) ที่พบในเชื้อแอสคิติมัยซีที่คัดเลือกมาศึกษาและมีแนวโน้มเป็นเชื้อสปิซีส์ใหม่

สกุล	รหัสเชื้อ	ชนิดของโพลาลิปิด (polar lipid type)									
		MK-8(H _{4ω-cycl})	MK-9(H ₀)	MK-9(H ₂)	MK-9(H ₄)	MK-9(H ₆)	MK-9(H ₈)	MK-10(H ₂)	MK-10(H ₄)	MK-10(H ₆)	MK-10(H ₈)
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
				3.93%	46.56%	45.46%	0.47%		1.83%	0.79%	0.94%
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
				9.57%	76.01%	7.91%	1.50%		4.66%	0.36%	
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
					5.73%	3.53%		7.58%	40.20%	35.70%	7.20%

4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

นำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี agar disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่แยกได้จำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลต ไม่พบการแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion

สกุล	รหัสเชื้อ	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)					
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>	<i>C.albicans</i>
<i>Streptomyces</i>	AN1-29	-	-	-	-	-	-
<i>Jishengella</i>	CP1-1	-	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	KK1-2	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

B. subtilis ATCC 6633

E. coli ATCC 25922

M. luteus ATCC 9341

Ps. aeruginosa ATCC 27853

S. aureus ATCC 25923

C. albicans ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย ได้แก่ กะลา กระเจียวขาว และ เปราะราตรี จากส่วนรากและใบ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมดจำนวน 3 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากได้ออกเป็น 3 กลุ่ม นำมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต AN1-29 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว สร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 2 ไอโซเลต CP1-1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม และเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อสร้างสปอร์ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อสกุล *Jishengella*

กลุ่มที่ 3 ไอโซเลต KK1-2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองแกมเขียวอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมดำเมื่อสร้างสปอร์ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

จากเชื้อแอคติโนมัยสีทข้างต้น นำมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียด พบว่า ไอโซเลต AN1-29 มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces glebosus* CGMCC 4.1873^T ในระดับ 98.40% เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อไอโซเลตดังกล่าว นี่เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces*

ไอโซเลต CP1-1 มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Jishengella endophytica* 202201^T ในระดับ 99.22% เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อไอโซเลตดังกล่าว นี่เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Jishengella*

ไอโซเลต KK1-2 มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Micromonospora rhizosphaerae* 211018^T ในระดับ 98.96% เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อไอโซเลตดังกล่าว นี่เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora*

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตด้วยวิธีการ Agar disc diffusion โดยใช้ จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต ไม่พบการแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จากข้อมูลที่ได้ทำการศึกษาทั้งหมดนี้ จะเห็นได้ว่าเนื้อเยื่อจากพืชสมุนไพรไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจแหล่งหนึ่ง ซึ่งมีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์สูง จึงเหมาะสมแก่การนำมาศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- จิราพร วรรณเวช.(2547).การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารต้านเชื้อราจากดิน.สาขา จุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยศิลปากร
- นันทวัน เนียมหอม.(2555).ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากป่าพรุ เขตร้อนอบอุ้นในประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- วาริรัตน์ หนูทิด.(2557).การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจาก พืชตระกูลขิง.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ศรีสกุล ชนะพันธ์.(2553).การแยกและคัดกรองเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสาร ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้.วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยศิลปากร
- Arai, T. 1975. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo.: The Society for Actinomycetes Japan.
- Carlsohn, M.R., Groth, I., Tan, G.Y., Saluz, H.P., Munder, T., Yang, J. Wink, J and Goodfellow, M. 2007. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. Nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. *Int. J.Syst. Bacteriol.* 57:1640-1646
- Cross, T. and Alderson, G. 1988 What weight morphology in current actinomycetes taxonomy. In: Okami, Y., Beppu, P.T. and Ogawa, H(eds.), *Biology in Actinomycetes*'88,(pp.216-220),Japan Scintific Soc. Press, Tokyo.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E. (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39, 224-229.
- Gonzalez, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. and Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequence. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 54: 401-415.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*. London : Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handerhan, J.E., and Pang, C.H. 1974 “*Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain” *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24 : 54-63.

Hayagawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29, 319–322.

Hayakawa, M., Tamura, T., Iino, H. and Nonomura, H 1991d. “Pollen-baiting and drying method for highly selective isolation of Actinoplanes spp. From soil.” *Journal of Fermentation and Bioengineering*.

Hirsch, P., Mevs, U. Kroppenstedt, R.M., Schumann, P and Stackebrandt, E. 2004. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock sample: *Micromonospora endolithica* sp. Nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 166-174

Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719-1728

Jiang, C. and Xu, L. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 249-253.

Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*. 19: 161-207.

Lorian, V. 1980. *Antibiotics in laboratory medicine*. pp. 161-207. Baltimore: The Williams & Wilkins.

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

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

Prabakar, V., Dube, S., Reddy, G. S. and Shivaji, S. 2004. *Pseudonocardia Antarctica* sp. Nov. an actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 66-71.

Sasser, M. 1990. “Identification of bacteria by gas chromatography of cellular acids.” *MIDI Technical Note 101*. Newark, Delaware : MIDI

Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 16, 313–340.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. 1997. “Proposal for a new

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T.

2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 417-422 (มี impact factor = 3.18)

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M., Sneath, P.H., Sackin,

M.J. (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera.

*J.Gen.Microbiol.*129, 1743–1813.

Yukphan, P. 2006. “Systematic study of acid bacteria isolated in Thailand.” Ph.D. of the United Graduated School of Agriculture Science, Gifu University. Japan.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารต่างๆ

Arginin – Vitamin (AV) agar (สูตรดัดแปลงที่เติมยาปฏิชีวนะ)

Glucose	1.0	กรัม
Glycerol	1.0	กรัม
L – arginine	0.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.3	กรัม
Trace element mixture 1	0.1	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Vitamin mix A1	1.0	มิลลิลิตร
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	0.025	กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% EtOH)	0.050	กรัม
Terbinafin (ละลายใน MtOH)	0.001	กรัม

Humic acid – vitamin agar (สูตรดัดแปลง) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

Humic acid(ละลายใน 0.2N NaOH 10 มิลลิลิตร)	1.0	กรัม
Yeast extract	0.050	กรัม
Casamino acids	0.020	กรัม
Na ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
KCl	1.7	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.050	กรัม
Cacl	0.010	กรัม
Trace elements mix 1	0.2	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Vitamin mix A1	1.0	มิลลิลิตร
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	0.025	กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% EtOH)	0.050	กรัม
Terbinafin (ละลายใน MtOH)	0.001	กรัม

Soil extrac agar (สูตรดัดแปลง) ที่เติมยาปฏิชีวนะ

CaSO ₄ 2H ₂ O	0.5	กรัม
Ca(NO ₃)4H ₂ O	0.25	กรัม
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05	กรัม
K ₂ SO ₄	0.03	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.02	กรัม
NaHCO ₃	0.1	กรัม
Trace element mix 1	0.3	มิลลิลิตร
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Casamino acids	0.1	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Soil extract	100	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Vitamin mix A1	1.0	มิลลิลิตร
Nalixidic acid (ละลายใน 0.2N NaOH)	0.025	กรัม
Cycloheximide (ละลายใน 95% EtOH)	0.050	กรัม
Terbinafin (ละลายใน MtOH)	0.001	กรัม
ThsimineHCL	0.05	กรัม
Biotin	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soil extrac agar (สูตรดัดแปลง)

CaSO ₄ 2H ₂ O	0.5	กรัม
Ca(NO ₃)4H ₂ O	0.25	กรัม
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05	กรัม
K ₂ SO ₄	0.03	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.02	กรัม
NaHCO ₃	0.1	กรัม
Trace element mix 1	0.3	มิลลิลิตร
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Casamino acids	0.1	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Soil extract	100	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		
<u>Soil extract</u>		
Humic soil	1	กิโลกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยสำลี และทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (นำส่วนใสไปใช้) และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

Vitamin mix A1

P – aminobenzoic acid	0.05	กรัม
Calcium pantothenate	0.05	กรัม
Inositol	0.05	กรัม
Niacin	0.05	กรัม
PyridoxinHCl	0.05	กรัม
Riboflavin	0.05	กรัม
ThsimineHCl	0.05	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biotin	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร		

Trace element mix 1

CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.0	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.0	กรัม
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0.1	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0	กรัม
KI	0.05	กรัม
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.5	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.0	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	กรัม
H ₂ SO ₄ 95 - 97% p.a.	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Glucose - yeast extract broth

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 6.8		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Yeast extract - malt extract agar (ISP2)

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

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oatmeal agar (ISP3)

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

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salts - starch agar (ISP4)

Soluble starch	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.0	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	กรัม
CaCO ₃	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0 - 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glycerol - asparagine agar (ISP5)

L - asparagines	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0 - 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone - yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar	36	กรัม
-------------------	----	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yeast extract	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0 - 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0	กรัม
L - tyrosine	0.5	กรัม
L - asparagines	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	0.5	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.01	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2 - 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salts solution

FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Carbon utilization medium (ISP9)Carbonsources

Carbohydrate	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร

Pridham and Gottlieb trace salts

CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.11	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Basal mineral salts agar

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	กรัม
KH ₂ PO ₄ • anhydrous	2.38	กรัม
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	5.65	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.0	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8 - 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
นำ Carbon sources มาผสมกับ Basal mineral salts agar

Glucose asparagine agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8 - 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Czapek's sucrose agar (Difco)

Sucrose	30.0	กรัม
NaNO ₃	2.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO ₄	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nutrient agar (Difco)

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

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk	100	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptonization test medium

Solution A

Skim milk	5	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Solution B

Agar	1	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้สารละลายเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงนำ Solution A มาผสมกับ Solution B

Boullion gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

pH 7.0 -7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone KNO₃ broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO ₃	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Basal inorganic nitrogen medium

Carbohydrate	10.0	กรัม
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0

0.4% Bromocresol purple	15.0	มิลลิลิตร
-------------------------	------	-----------

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Tryptic Soy Agar (Difco)

Pancreatic Digest of Casein	17.0	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sabouraud dextrose agar

Special peptone	10.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

Basic lauryl - sulfate solution

Na - lauryl sulfate	0.1	กรัม
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8 - 7.0 (KOH/HCL)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tween 80 solution

Tween	0.1	มิลลิลิตร
KH_2PO_4	1.75	กรัม
K_2HPO_4	3.5	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

pH : 6.8 - 7.0 (KOH/HCL)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15% Phenol solution

Phenol	15	มิลลิลิตร
Distilled water	985	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Flooding solution

skim milk	0.1	กรัม
5 mM CHES		
(N - cyclohexyl - 2 - amino - ethanesulfonic acid)		
(pH 9.0)	100	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sulphanillic acid solution

Sulphanillic acid	0.8	กรัม
5 N Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย Sulphanillic acid ใน 5 N Acetic acid โดยใช้ความร้อน

N,N - dimethy - 1 naphthylamine solution

N,N - dimethy - 1 naphthylamine	0.5	กรัม
5N Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย N,N - dimethy - 1 naphthylamine ใน 5N acetic acid โดยใช้ความร้อน

Aniline phthalate

phthalic acid	3.25	กรัม
water - saturate n - butanol	100	มิลลิลิตร
aniline	2	มิลลิลิตร

สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ Polar lipids

Dittmer & Lester reagentSolution A

Molybdcic anhydride (MoO_3)	4.011	กรัม
25N sulfuric acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย Molybdcic anhydride ใน 25N sulfuric acid โดยใช้ความร้อน

Solution B

Molybdcic anhydride (MoO_3)	0.178	กรัม
Solution A	50	มิลลิลิตร

ละลาย Molybdcic anhydride ใน Solution A โดยใช้ความร้อนและต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทแยกส่วนที่ตกตะกอนทิ้ง

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ninhydrin reagent

Ninhydrin	0.4	กรัม
water - saturated n - butanol	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anisaldehyde reagent

Ethanol	90	มิลลิลิตร
Sulfuric acid	5	มิลลิลิตร
p -Anisaldehyde	5	มิลลิลิตร
Acetic acid	1	มิลลิลิตร

Dragendorff reagentSolution A

basic bismuth nitrate	1.7	กรัม
Acetic acid	80	มิลลิลิตร

Solution B

KI	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

*เตรียมใหม่ก่อนใช้โดยผสม Solution A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ Acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid)Reagent 1. Saponification reagent

Sodium hydroxide	15	กรัม
Methanol (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Milli - Q water	50	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium hydroxide ใน Milli - Q water ก่อนแล้วค่อยผสมกับ Methanol

Reagent 2. Methylation reagent

6N Hydrochloric acid	65	มิลลิลิตร
Methanol (HPLC grade)	55	มิลลิลิตร

pHต่ำกว่า1.5

Reagent 3. Extraction solvent

n - Hexane (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร
Methyl - tert - Butyl Ether (HPLC grade)	50	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reagent 4. Base wash

Sodium hydroxide	1.2	กรัม
Milli - Q water	100	มิลลิลิตร

Reagent 5. Saturated sodium chloride

sodium chloride	40	กรัม
Milli - Q water	100	มิลลิลิตร

การเตรียม Dowex (CH₃COO⁻)

1. แช่ Dowex 1 ใน 2N NaOH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองแก้วแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) เท่ากับ 7
2. แช่ Dowex 1 ใน 2N CH₃COOH เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองแก้วแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) เท่ากับ 7

DON reagent

2,7 - Dihydroxynaphthalene	10	มิลลิกรัม
sulfuric acid	50	มิลลิลิตร

ละลาย 2,7 - Dihydroxynaphthalene ใน sulfuric acid เข้มข้น หุ้มภาชนะที่บรรจุด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ เก็บไว้ค้างคืนในที่มืด สารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี

TE buffer

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

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1M EDTA (pH 8.0)

EDTA	372.24	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ผสม EDTA กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

1M Tris - Cl (pH 8.0)

Tris - base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น		

ผสม Tris - base กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HClปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

RNase A	100	มิลลิกรัม
0.15 M NaCl	10	มิลลิลิตร

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Proteinase K	100	มิลลิกรัม
50 mM Tris - HCl	10	มิลลิลิตร

pH 7.5

20xSSC

NaCl	175.3	กรัม
Tris - sodium citrate.2H ₂ O	88.2	กรัม

น้ำกลั่น

ชั่ง NaCl และ Tris - sodium citrate.2H₂O ใส่ในน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากันปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 10 M NaOHปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1xSSC

20xSSC	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	95	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารที่ใช้ในการทำ DNA -DNA Hybridization

10xPBSM

MgCl ₂ •7H ₂ O	95	มิลลิกรัม
10xPBS	10	มิลลิลิตร

Pre - hybridization solution

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

Hybridization solution

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

Solution I

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

Solution II

Streptavidin POD	1	ไมโครลิตร
Solution I	4	มิลลิลิตร

Solution III

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100x denhardt solution

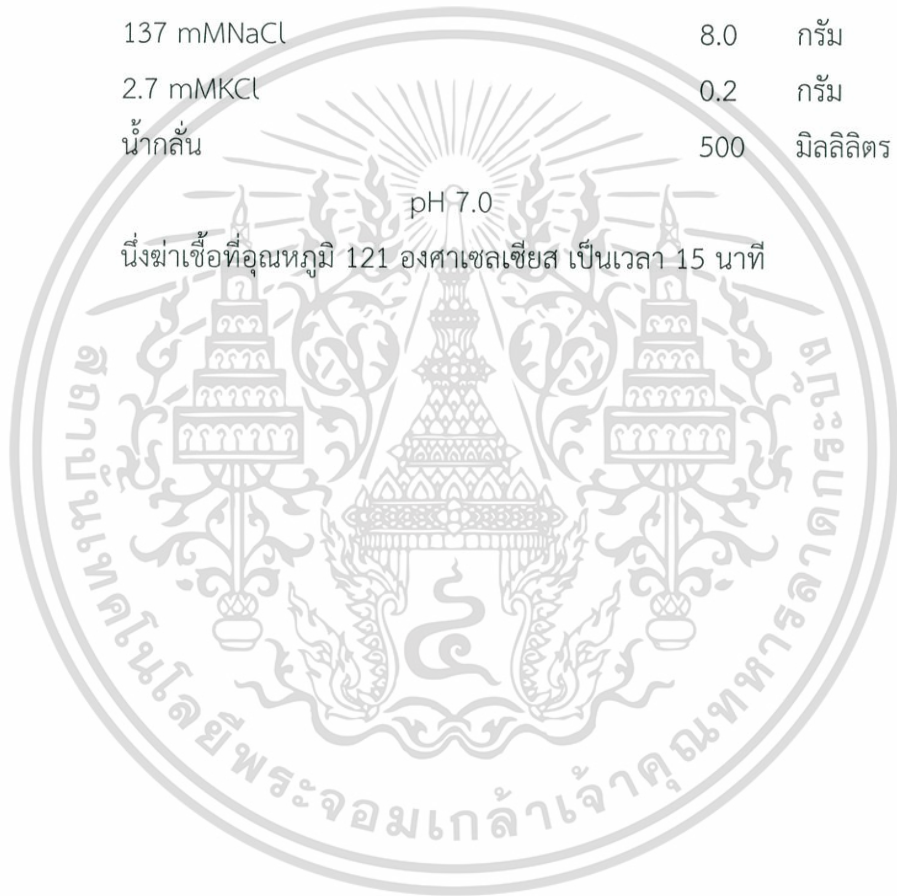
Bovine serum albumin (fraction V)	2	กรัม
Polyvinylpyrrolidone	2	กรัม
Ficoll 400	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2xPBS

8 mM Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
1.5 mM KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
137 mMNaCl	8.0	กรัม
2.7 mMKCl	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

pH 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียม Buffer ทดสอบการเจริญที่ pH ต่างๆ

1. สารละลาย McIlvaine หรือ ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์
(0.1 M citrate phosphate buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 19.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์
($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม
ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตารางปรับปริมาตรเป็น 100 มล.
ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.1 M citric acid (ml)	0.2 M sodium phosphate (ml)
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.2	29.4	20.6
4.6	26.7	23.3
5.0	24.32	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.2	16.9	33.1
6.6	13.6	36.4
7.0	6.5	43.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M phosphate buffer)

สารละลาย A : สารละลายโมโน โซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (monobasic sodium phosphate) สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต 27.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (ละลาย

$Na_2HPO_4, 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4, 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น เป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตารางปรับปริมาตรเป็น 200 มล. ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.2 M monosodium phosphate(ml)	0.2 M di-sodium phosphate (ml)
5.7	93.5	6.5
5.9	90.0	10.0
6.0	87.7	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.5	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.6
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	28.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0
7.7	10.5	90.5
7.8	8.5	91.5
8.0	5.3	94.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียม $Na_2HPO_4 - NaOH$ buffer ตามวิธีการของ Bates and Ower (1956 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และ สารละลาย B X มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M Na_2HPO_4 (7.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M $NaOH$ (2.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร)




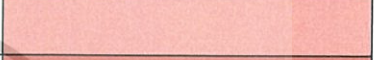




















pH	B (มิลลิลิตร)
10.9	3.3
10.0	4.1
11.1	5.1
11.2	6.3
11.3	7.6
11.4	9.1
11.5	11.1
11.6	13.5
11.7	16.2
11.8	19.4
11.9	23.0
12.0	26.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





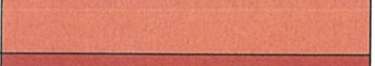

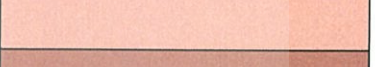

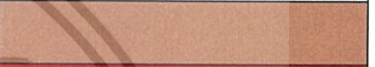











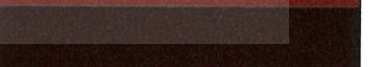
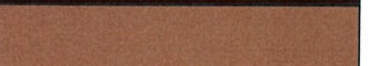

ภาคผนวก ง

The NBS/IBCC Color System

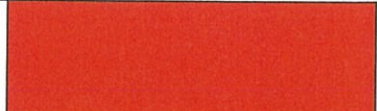

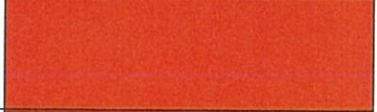
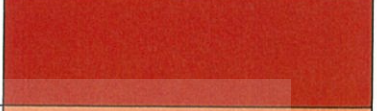

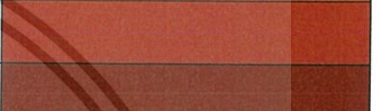




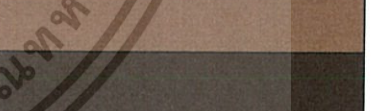

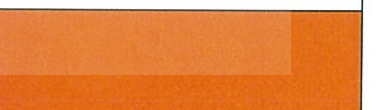

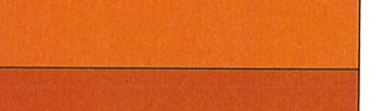
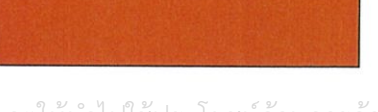


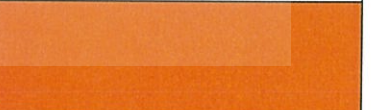


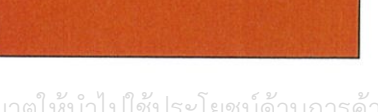
The 267 Color Centroids

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตเผยแพร่แบบอิสระขอสงวนสิทธิ์ในกรทำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yellowish Pink			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	
28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B	
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374	
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C	
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8	
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85	
Reddish Orange, Reddish Brown			
33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B	
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13	
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961	
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11	
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339	
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F	
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#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	
Orange Brown			




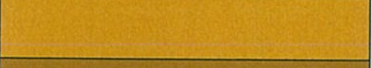



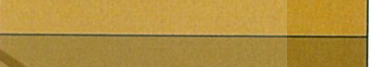
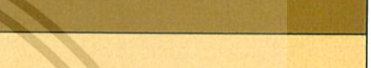








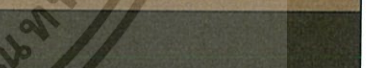


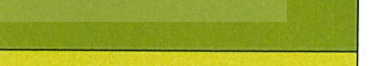



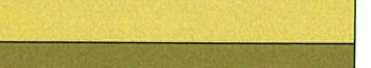
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800	
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841	
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A	
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A	
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161	
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E	
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124	
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313	
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E	
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540	
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923	
59 Dark Brown	5.3yr 1.6 3.4	#35170C	
60 Light Grayish Brown	6.4yr 5.4 2.2	#946B54	
61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30	
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A	
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C	
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33	
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B	
Orange Yellow, Yellowish Brown			
66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00	
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E	
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D	
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00	

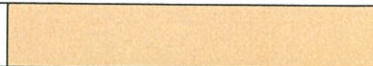

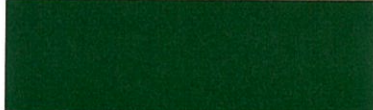
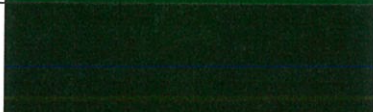

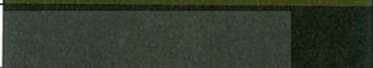

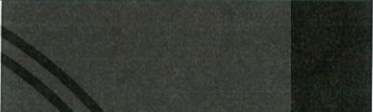





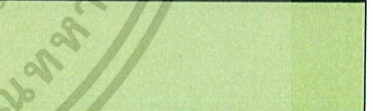

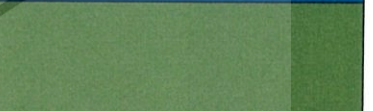




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961	
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C	
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629	
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86	
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C	
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315	
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54	
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D	
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512	
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764	
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840	
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F	
Yellow, Olive Brown			
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	
Yellowish Green			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	







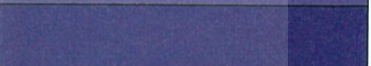
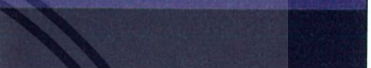
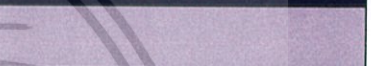


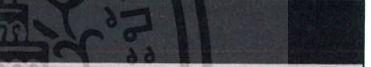
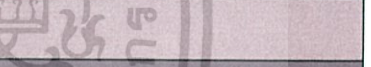



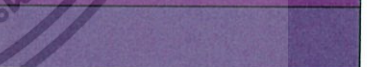


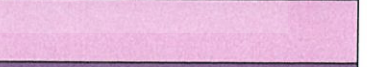



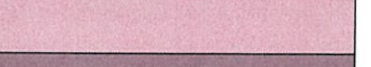

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นาไปรษณียบัตร
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613	
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB	
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96	
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666	
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B	
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513	
Bluish Green			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
Greenish Blue			
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 Very Light Greenish Blue			
	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 Moderate Greenish Blue			
	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	
Blue			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
	2.9pb 4.1		
178 Strong Blue	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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
Purplish Blue			
	7.8pb 2.0		
194 Very Purplish Blue	12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
	8.0pb 4.0		
196 Strong Purplish Blue	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	#BAACCC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	
Violet			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


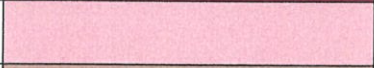
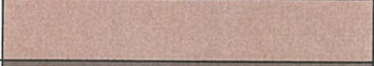



215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
Purple			
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B	
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C	
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35	
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018	
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8	
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E	
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B	
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042	
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116	
Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายกเว้นกรณีอื่น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้