



การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอดคิโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดย

นางสาวลลิตา วังเงิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอดิโนมัยสืทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดย

นางสาวลลิตา วังเงิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**SCREENING AND IDENTIFICATION OF RARE ACTINOMYCETES FOR BIOLOGICAL
ACTIVITY**

By

Lalida Vachangken

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biotechnology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การคัดกรองและการ
พิสูจน์เอกลักษณ์แอดิโนมัยสัทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ” เสนอโดย นางสาวลลิตา วังเงิน เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. อาจารย์ ดร.บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ
2. รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์
3. เกษักรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ถิรมัททวาริทธิ์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(เกษักรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนิย์ เตชะอาภรณ์กุล)
...../...../.....

..... กรรมการ	 กรรมการ
(เกษักรหญิง ดร.สุชาดา จรุงเรืองโชค)	(อาจารย์ ดร.บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ)
...../...../.....	/...../.....

.....กรรมการ	 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์)	(เกษักรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ถิรมัททวาริทธิ์)
...../...../.....	/...../.....

50401209: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, รากหน่อไม้ฝรั่ง, *Micromonospora*

ลลิตา วังเงิน : การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ.ดร.บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ , รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ และ ญ.รองศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรดี. 115 หน้า.

ทำการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินรอบรากและจากรากหน่อไม้ฝรั่งจากแปลงเกษตรอินทรีย์ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และเพชรบุรีได้จำนวน 25 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ขึ้นต้น พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 10 สายพันธุ์ (40%) ส่วนที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมลบได้ 8 สายพันธุ์ (32%) ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ 7 สายพันธุ์ (28%) และไม่สามารถยับยั้งยีสต์ได้เลย ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยสีท 14 สายพันธุ์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีมาทำการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์พบว่า 13 สายพันธุ์ จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และ 1 สายพันธุ์จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* แล้วจึงทำการคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดมาจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 และ PKB32-19 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และ PKB32-24 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Microbispora* เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ต่อไป นอกจากนี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์ PKB32-7-22 และ PKB32-24 เพื่อศึกษาลักษณะทางเคมีไทป์และจีโนมไทป์เฉพาะสองสายพันธุ์ เนื่องจากมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียหลายชนิด พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มี *meso*-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ สายพันธุ์ PKB32-7-22 มีกรดไขมันชนิด iso-C_{15:0} (21.2%), iso-C_{16:0} (23.1%) และ anteiso-C_{17:0} (10.3%) และเมนาควิโนนชนิด MK-9H₄ และ MK-9H₈ เป็นองค์ประกอบหลัก สรุปว่าสายพันธุ์ PKB32-7-22 มีความใกล้เคียงกับ *M. chersinia* DSM 44151^T, *M. inositol* DSM 43819^T และ *M. endolithica* DSM 44398^T เป็น 99 % ของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ซึ่งจัดเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Micromonospora* ส่วนสายพันธุ์ของ PKB32-24 มีเมนาควิโนนชนิด MK-9H₀ และ MK-9H₂ เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Mb. corallina* DSM 44682^T และ *Mb. rosea* subsp. *rosea* DSM 43839^T เป็น 98 % ของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene จัดเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Microbispora* นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากโคคลอโรไมเทินของสายพันธุ์ PKB32-24 สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ดิสก์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1.2. 3.

50401209: MAJOR : (BIOTECHNOLOGY)

KEY WORD: ACTINOMYCETES/ ANTIMICROBIAL ACTIVITY/ ASPARAGUS ROOT/
MICROMONOSPORA

LALIDA VACHANGKEN : SCREENING AND IDENTIFICATION OF RARE
ACTINOMYCETES FOR BIOLOGICAL ACTIVITY. THESIS ADVISORS: BUSAYA
APICHAISATAIENCHOTE, Ph.D., ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D, AND
ASSOC. PROF. CHUTIMA LIMMATVAPIRAT, Ph.D., 115 pp.

Twenty-five actinomycete strains were isolated from soil around asparagus root and from asparagus root of healthy plants grown in organic farm from Prachuabkhirikan and Phetchaburi provinces. On primary screening for antimicrobial activities, 10 strains (40%) showed the activities against Gram-positive bacteria and 8 strains (32%) inhibited Gram-positive and Gram-negative bacteria. Sevens strains showed no activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria including yeast strain. Fourteen potent strains were selected for their phenotypic characterization. Thirteen strains were belonged to the genus *Micromonospora* and one strain was *Microbispora*. PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 and PKB32-19 identified as *Micromonospora* and PKB32-24 identified as *Microbispora* were selected for further phenotypic characterization. Strains PKB32-7-22 and PKB32-24 were selected for chemotaxonomic and genotypic characterization based on their antibacterial activities. Both strains contained meso-diaminopemelic acid in cell wall. Strains PKB32-7-22 contained iso-C_{15:0} (21.2%), iso-C_{16:0} (23.1%) and anteiso-C_{17:0} (10.3%) as major cellular fatty acids and MK-9H₄ and MK-9H₈ as major menaquinones. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences showed that strain PKB32-7-22 was a novel species of the genus *Micromonospora* which was closely related to *M. chersinia* DSM 44151^T, *M. inositola* DSM 43819^T and *M. endolithica* DSM 44398^T with 99% similarity. Strain PKB32-24 contained MK-9H₀ and MK-9H₂ as major menaquinones. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences showed that strain PKB32-24 was a novel species of the genus *Microbispora* which was closely related *Mb. corallina* DSM 44682^T and *Mb. rosea* subsp. *rosea* DSM 43839^T with 98% similarity. In addition, the dichloromethane crude extract of strain PKB32-24 inhibited *Bacillus subtilis* ATCC 6633 at 20 mg/disc.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn Univerysit Academic Year 2011

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจาก อ.ดร. บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์ และ ญ. รศ. ดร. ชูติมา ลิ้มมัท วาภิรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ พร้อมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ญ.ผศ.ดร. สุณีย์ เตชะอารณกุล ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และ ดร.สุชาดา จรุงเรืองโชค ซึ่งกรุณาเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับบิดา มารดา น้อง และครอบครัว ผู้วิชัย ที่คอยให้กำลังใจ ให้การและสนับสนุนในทุกด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์การศึกษา.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
แอกติโนมัยสีท.....	3
แอกติโนมัยสีทในธรรมชาติ.....	3
การพิสูจน์เอกลักษณ์และการคัดกรองแอกติโนมัยสีท.....	4
ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท.....	6
แอกติโนมัยสีทหายาก (Rare actinomycetes).....	15
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากแอกติโนมัยสีทหายาก.....	25
3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	27
สารเคมีและอุปกรณ์.....	27
วิธีการทดลอง.....	29
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
5 สรุปผลการทดลอง.....	71
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก.....	85
ภาคผนวก ข.....	90
ภาคผนวก ค.....	93

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ง.....	107
ภาคผนวก จ.....	109
ประวัติผู้วิจัย.....	115

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอคติโนมัยซีท.....	10
2	ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ของแอคติโนมัยซีทที่มี diaminopimelic ชนิด meso ไอโซเมอร์.....	11
3	การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมี ของเซลล์	12
4	แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอคติโนมัยซีท.....	13
5	แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของสกุลต่างๆ ของแฟมิลี <i>Micromonosporaceae</i>	16
6	แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของสกุลต่างๆของแฟมิลี <i>Streptosporangiaceae</i>	17
7	ลักษณะของสกุล <i>Micromonospora</i> สปีชีส์ต่างๆ.....	20
8	ลักษณะของสกุล <i>Microbispora</i> สปีชีส์ต่างๆ	23
9	แสดงการแยก <i>Streptomyces</i> จากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง.....	36
10	แสดงการแยกแอคติโนมัยซีทหายากจากรากหน่อไม้ฝรั่ง.....	37
11	แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น.....	39
12	แสดงลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....	44
13	แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ.....	46
14	แสดงผลทดสอบทางสรีรวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก.....	54
15	ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก.....	55
16	การใช้แหล่งคาร์บอนของแอคติโนมัยซีทหายาก.....	56
17	ผลการวิเคราะห์ชนิดของ menaquinone.....	58
18	กรดไขมันของสายพันธุ์ PKB32-7-22 และ <i>M. chersina</i>	59
19	ลักษณะของ PKB32-7-22 เทียบกับ <i>M. chersina</i> DSM 44151 ^T , <i>M. endolithica</i> DSM 44398 ^T และ <i>M. inositol</i> DSM 43819 ^T	64
20	ลักษณะของ PKB32-24 เทียบกับ <i>Mb. rosea subsp. rosea</i> DSM 43839 ^T และ <i>Mb.</i> <i>corallina</i> DSM 44682 ^T	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	ปริมาณและลักษณะของสารสกัดหยาบของแอคติโนมัลลิตายาก สายพันธุ์ต่างๆ.....	70
22	การยับยั้ง <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบ ของแอคติโนมัลลิตายากสายพันธุ์ต่างๆ.....	70
23	แสดง The NBS/IBCC Color System.....	94
24	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่แยกได้ จากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง.....	108

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียใน class <i>Actinobacteria</i> โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบน ยีน 16S rRNA.....	5
2	แสดงโครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอสโตโนไมซีตพันธุ์เซลล์.....	9
3	แสดงโครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด meso-isomer ของแอสโตโนไมซีตพันธุ์ เซลล์.....	9
4	แสดงลักษณะโครมาโทกราฟีที่ได้จากการวิเคราะห์ผนังเซลล์แอสโตโนไมซีต.....	10
5	แสดง isoprenoid quinones ที่พบในแบคทีเรีย.....	14
6	โครงสร้างทางเคมีของ cyclo- (L-Pro-L-Met).....	26
7	แสดงลักษณะของโคโลนีของแอสโตโนไมซีตบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน.....	51
8	แสดงลักษณะของสปอร์ของแอสโตโนไมซีตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่อง กรดกำลังขยาย 15,000 เท่า.....	52
9	แสดงตำแหน่ง PKB32-7-22 บน Phylogenetic tree	62
10	แสดงตำแหน่ง PKB32-24 บน Phylogenetic tree	66
11	แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสายพันธุ์ PKB31-19 และ สายพันธุ์ PKB32-24	70
12	แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PKB32-7-22.....	111
13	แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PKB32-24.....	113
14	แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PKB32-24.....	114

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนมัยสีทจัดอยู่ในกลุ่มโปรคาริโอตเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เป็นแบคทีเรียแกรมบวกแต่มีการสร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีน (% C+G) ในดีเอ็นเอมากกว่า 50% (Skyles และ Skinner, 1973) มีการสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ โดยสปอร์ที่สร้างอาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ และสายสปอร์ (Couch, 1963; Vobis, 1987) เส้นใยของแอกติโนมัยสีทประกอบด้วยเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โคโลนีที่บ่งแสง ผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ หนูน ขรุขระ เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด โคโลนีมีหลากหลายสี เช่น สีเขียว สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้ำ เขียว และดำ (Holt *et al.*, 1994)

แอกติโนมัยสีทที่มีการกระจายตัวและหนาแน่นมากในดินคือ แอกติโนมัยสีทกลุ่ม *Streptomyces* นอกจากนี้ยังมีแอกติโนมัยสีทกลุ่ม non-streptomyces หรือที่เรียกว่าแอกติโนมัยสีทหายาก (rare actinomycetes) มีประมาณ 100 สกุล มีความแตกต่างกันทั้งทางรูปร่าง วิวัฒนาการ และนิเวศวิทยา (Hayakawa *et al.*, 1988) แอกติโนมัยสีทสามารถพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ โคลน ปมรากพืช และ อากาศ (Skyles และ Skinner, 1973) นอกจากนี้พบว่าได้มีการศึกษาและจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากพืชหลายชนิด เช่น กัญชง (Cao *et al.*, 2004) มะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004) ข้าวโพด (Janet *et al.*, 2000) ข้าวสาลี (Coombs *et al.*, 2003) และสมุนไพรต่างๆ (ปิยธิดา, 2549)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์แอกติโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากหน่อไม้ฝรั่งเพื่อนำไปใช้ในการเกษตรต่อไป

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อคัดกรองแอคติโนมัยสีทหายากจากรากและดินบริเวณรอบรากหน่อไม้ฝรั่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีทหายากจากรากและดินบริเวณรอบรากหน่อไม้ฝรั่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอบเขตของการศึกษา

1. คัดกรองแอคติโนมัยสีทหายากจากรากและดินบริเวณรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง
2. คัดกรองแอคติโนมัยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. พิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีทหายากจากรากและดินบริเวณรอบรากหน่อไม้ฝรั่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถแยกได้สายพันธุ์แอคติโนมัยสีทหายากที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและได้ข้อมูลความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทหายากจากรากและดินบริเวณรอบรากหน่อไม้ฝรั่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทอยู่ในอันดับ *Actinomycetales* (Miyadoh, 1997) ในดีเอ็นเอของแอคติโนมัยสีทมีปริมาณ G+C ใน CG content 57-75% (Lo *et al.*, 2002) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต มีเส้นใยคล้ายรา (Ames *et al.*, 1984; Nonomura, 1989a; Halder *et al.*, 1991; Elliot และ Lynch, 1995) โดยการสร้างเส้นใยแบ่งเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยสีทประกอบด้วย mucopeptide (*N*-acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*-acetyl muramic acid); 2,6-diaminopimelic acid; glutamic acid, glycine และ alanine (David, 1959)

2.2 แอคติโนมัยสีทในธรรมชาติ

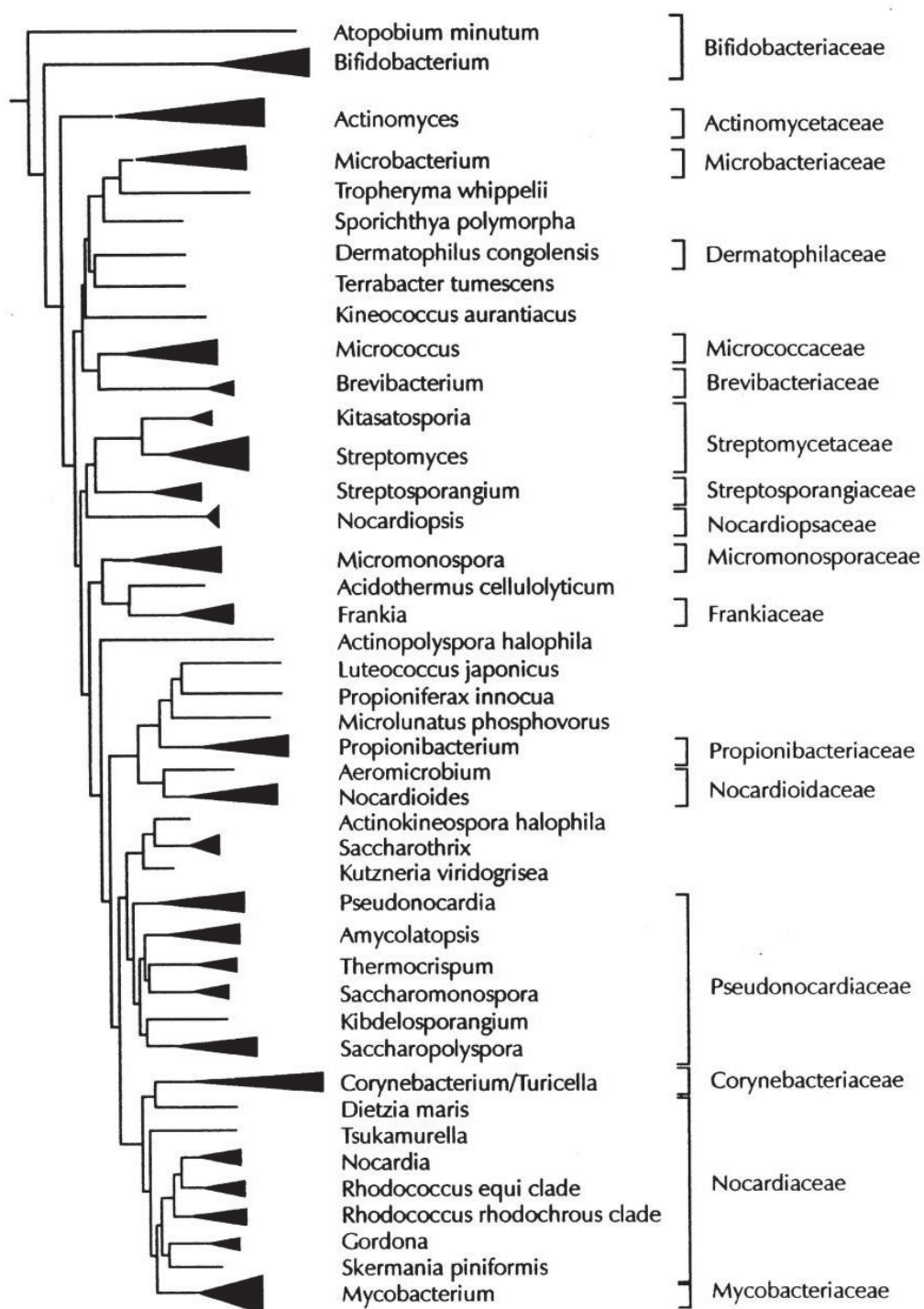
แอคติโนมัยสีทพบทั่วไปทั้งในดิน น้ำ อากาศ โคลน มูลสัตว์ อากาศ และในพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน แอคติโนมัยสีทจะพบมากในดินชั้นบนและจะลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลง พบแอคติโนมัยสีทมากกว่า 100 สกุล ในดินที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมีความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.5-8.0 นอกจากนี้ยังพบมากในดินรอบรากพืช (rhizosphere) (Holt *et al.*, 1994) แอคติโนมัยสีทที่พบมากที่สุดที่ดิน คือ *Streptomyces* พบประมาณ 70-90% รองลงมา คือ *Nocardia* พบประมาณ 10-30% และ *Micromonospora* พบประมาณ 1-15% แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นพวก saprophyte (Alexander, 1977) มีความสำคัญในการย่อยอินทรีย์สาร (Goodfellow, 1985) ย่อยเคอราติน ไคติน เซลลูโลส และแป้ง (McCarthy และ William, 1992; Holmalahi *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังสามารถพบแอคติโนมัยสีทจากแหล่งน้ำ และสามารถย่อยสลายสารที่เป็นพิษบางชนิดได้ เช่น ฟีนอล รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์และสารเมแทบอลิต์ที่มีประโยชน์อื่นๆ เช่น เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และไฟบริโนไลซิน (fibrinolysin) (Jiang และ Xu, 1996) เป็นต้น แอคติโนมัยสีทสามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด แหล่งน้ำเค็ม ดินตะกอนใต้ทะเล (Colquhoun *et al.*, 1998; Pathom-aree *et al.*, 2006) รวมถึงพืชและสัตว์ที่อยู่ใต้ทะเล (Zheng *et al.*, 2000) เช่น สาหร่ายและฟองน้ำ (Jensen *et al.*, 2005a) แอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และ *Streptomyces* (Jiang และ Xu, 1996; Terkina *et al.*, 2002) แหล่งอื่นที่มีรายงานว่าสามารถพบแอคติโนมัยสีท ได้แก่ พื้นผิวของหินในเหมืองหินชนวนยุคกลาง

(medieval slate mine) (Carlsohn *et al.*, 2007) หินและกรวดในเขตแอนตาร์กติก (Hirsch *et al.*, 2004; Prabakar *et al.*, 2004) และในไลเคน (González *et al.*, 2005) เป็นต้น

2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการคัดกรองแอคติโนมัยสีท

การพิสูจน์และจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับสกุลสามารถใช้ข้อมูลจากองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบและไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในผนังเซลล์ และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ องค์ประกอบของ phospholipid ชนิดของกรดไขมัน และ ชนิดของเมนาควิโนน (Boone และ Pine, 1968; Lechevalier and Lechevalier, 1980) รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่น การงอกของสปอร์ การแตกกิ่งของเส้นใย การรวมตัวของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ และการสร้างรงควัตถุละลายน้ำ (Holt *et al.*, 1994) ศึกษาการรวมตัวของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ส่วนผิวของสปอร์และโครงสร้างของสปอร์ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยข้อมูลทางด้าน 16S rRNA มีส่วนสำคัญในการจำแนกแอคติโนมัยสีทถึงระดับสปีชีส์ จากข้อมูล 16S rDNA นำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งแอคติโนมัยสีทได้มากกว่า 100 สกุล (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียใน class *Actinobacteria* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบน ยีน 16S rRNA (Goodfellow, 1989a)

2.4 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

การศึกษาลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีทเพื่อใช้ในการจัดจำแนกหมวดหมู่แอคติโนมัยสีทเบื้องต้นได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมี และลักษณะทางจีโนมไทป์

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.4.1.1 โคลนิน

โคลนินของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการรวมตัวของเส้นใย (mycelium) ที่หนาแน่น จากนั้นเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคลนิน เช่น การสร้างสปอร์ โดยเริ่มจากการสร้างผนังกัน โดยทั่วไปมักสร้างผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัวและเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutska และ Agre, 1976) แต่มีแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ได้แก่ *Micromonospora* และ *Actinoplanes*

ลักษณะของโคลนินอาจจะมีแบบยกตัวขึ้น (raised) หรือ แบนเรียบ (flat) บางครั้งอาจจะมีลักษณะคล้ายหนัง (leathery layer) ซึ่งมีตั้งแต่อ่อนนุ่ม และ เหนียวไปจนถึงแข็งมาก สีของโคลนินมีตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง กุหลาบ แดง ม่วง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล และดำ ผิวหน้าของโคลนินอาจมีลักษณะเรียบ ขรุขระ หนูน เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกร็ด ขนาดของโคลนินขึ้นอยู่กับปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญเติบโต ซึ่งจะมีขนาดต่างๆ ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางระดับมิลลิเมตร ไปจนถึงเซนติเมตร

2.4.1.2 โครงสร้างภายในของเส้นใย

เส้นใยเดี่ยวมีความหนาประมาณ 0.4-1.2 ไมโครเมตร มีผนังกัน และเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักในเส้นใยแสดงถึงการเป็นโปรคาริโอตคือ ไซโตพลาสซึม ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซมและสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น polyphosphate, lipid หรือ polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดเป็นมิโซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

2.4.1.3 สปอร์

แอคติโนมัยสีทมีการสร้างสปอร์เป็น 3 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้างภายนอก ได้แก่ สปอร์เดี่ยว สปอร์เป็นสาย และการสร้างสปอร์ในอับสปอร์

1. สปอร์เดี่ยว

การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอคติโนมัยสีทเรียกว่า monosporous พบในหลายสกุลเช่นในสกุล *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophore) สร้างสปอร์บนสายใยอาหาร (Kawamoto, 1989) ส่วนสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชู

สปอร์ และ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ และมีก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนง (McCarthy, 1989)

2. การสร้างสปอร์เป็นสาย

การสร้างสปอร์เป็นสายพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์เช่นการสร้างสายสปอร์คู่หรือ bisporous ในสกุล *Microbispora* มีการสร้างสปอร์รูปทรงรี 2 สปอร์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร

การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของแอคติโนมัยซีพัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ จำนวนสปอร์ที่พบคือ 7-10 สปอร์ต่อสาย ส่วนจำนวนสปอร์น้อยที่สุดที่พบคือ 3 สปอร์ มีบางสปีชีส์มีสปอร์มากถึง 30 สปอร์สปีชีส์ (Korn-Wendisch *et al.*, 1989) ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสายสปอร์สั้นๆบนเส้นใยอากาศ ในสกุล *Microtetraspora* พบจำนวนสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์จนถึง 20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อนตั้งแต่ 1 จนถึง 4 ชั้น ส่วนสกุล *Streptoverticillium* พบว่าเส้นใยที่มีสายสปอร์จะเกิดการบิด (Locci และ Balcan, 1971) สายสปอร์สั้นที่สร้างอาจจะตรง โค้งงอ ปลายเป็น (Locci และ Schofield, 1989) ในสกุล *Macrospora*, *Microcelobospora* และ *Elytrosporangium* สปอร์มีลักษณะใหญ่บนสายสปอร์สั้นบนเส้นใยอาหาร (Cross และ Alderson, 1988)

จากความแตกต่างของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ 4 ลักษณะ คือ (Ettlinger *et al.*, 1958; Pridham *et al.*, 1958; Korn-Wendisch และ Kutzner, 1992)

A. *Rectiflexibiles*: สายโซ่ของสปอร์เป็นแบบเส้นตรงหรือเป็นแบบโค้งงออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

B. *Retinaculiaperti*: สายโซ่จะเป็นห่วง (hooks) แบบห่วงเปิดแบบสั้น หรือม้วนเป็นวงกลมประมาณ 1-3 วง

C. *Spira*: สายโซ่สปอร์แบบเกลียว แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ a) แบบปิด และเกลียวอัดกันแน่น b) แบบเปิด เกลียวยาวและขยายออก

D. *Verticillati*: สายโซ่สปอร์เป็นแบบเกลียวกันหอย และมีการแตกกิ่งออกมาเหมือนร่ม

3. การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่สามารถสร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ

กลุ่มที่สามารถอับสปอร์บนเส้นใยอาหารประกอบด้วยสกุล *Actinoplanes*, *Pilimelia* และ *Dactylosporangium* เป็นต้นโดยสกุล *Actinoplanes* มีลักษณะอับสปอร์ทรงกลมหรือ

เกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่ไม่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตรอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรงมีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดมกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังหุ้ม แต่สปีชีส์ *Ampullariella* สร้างอับสปอร์ที่มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด จนถึงไม่เป็นรูปทรง ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963; Vobis, 1987) ในสกุล *Pilimelia* มีการสร้างอับสปอร์บนผิวอาหาร ซึ่งมีทั้งรูปทรงกระบอก และทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร และมีการสร้างสปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวอกวนไม่เป็นระเบียบ (Vobis, 1984) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสกุลที่สามารถสร้างอับสปอร์ เช่น สกุล *Dactylosporangium* มีสปอร์แบบ oligosporus คือมีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้ว (Vobis และ Kothe, 1985)

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียง 1 สปอร์ (Vobis, 1986) สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่กันในอับสปอร์ (Thieman *et al.*, 1968) สกุล *Planatetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmoa และ Junying, 1993) สกุล *Planopolyspora* มีสปอร์จำนวนมากในอับสปอร์เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร (Petrolini *et al.*, 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร และมีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวต่อกันเป็นสายยาวขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ (William และ Sharples, 1976; Petrolini *et al.*, 1992) ปัจจุบันมีการแยกสกุล *Kutzneria* ออกจากสกุล *Streptosporangium* โดยพบว่าสกุล *Kutzneria* มีการสร้างอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บางอยู่บนก้านชูสปอร์ยาว สกุล *Spirillospora* มีอับสปอร์เป็นทรงกลมหรือรูปร่างเหมือนหนอน (vermiform) เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่งและโค้งงอ (Vobis, 1986)

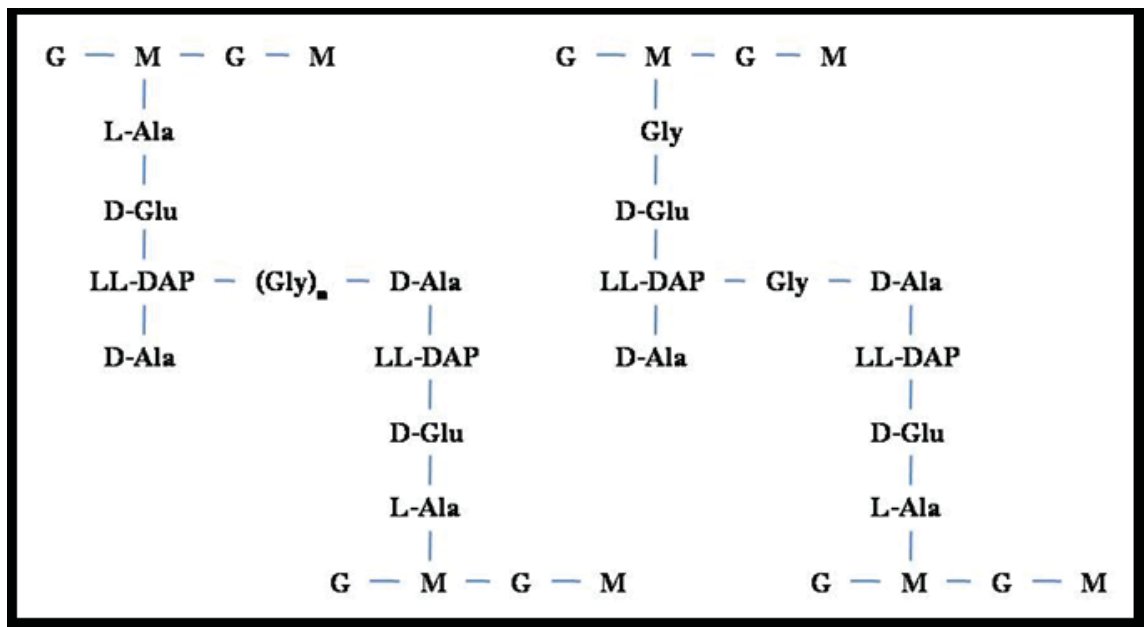
2.4.2 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

2.4.2.1 Diaminopimelic acid

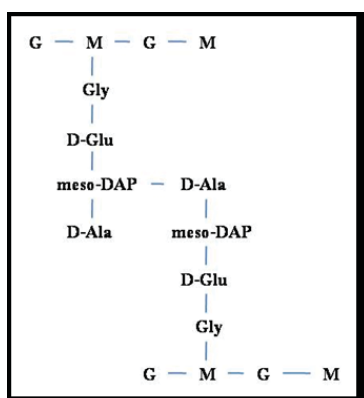
ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทประกอบด้วย diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ LL-DAP และ meso-DAP (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)

Becker และคณะ (1965) ศึกษาชนิดของ DAP ที่ผนังเซลล์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ในการแยกความแตกต่างระหว่าง LL-DAP และ

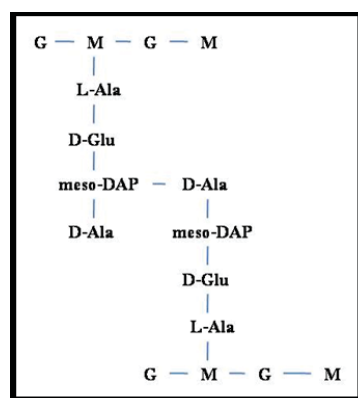
meso-DAP พบว่า LL-DAP จะเคลื่อนที่เร็วกว่า *meso*-DAP และอยู่ด้านบน ในขณะที่กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ให้สีม่วงและเคลื่อนที่เร็วกว่า DAP (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอคติโนมัยซีทผนังเซลล์
กลุ่มที่ I, M = NAM และ G = NAG (Kudo, 2008)

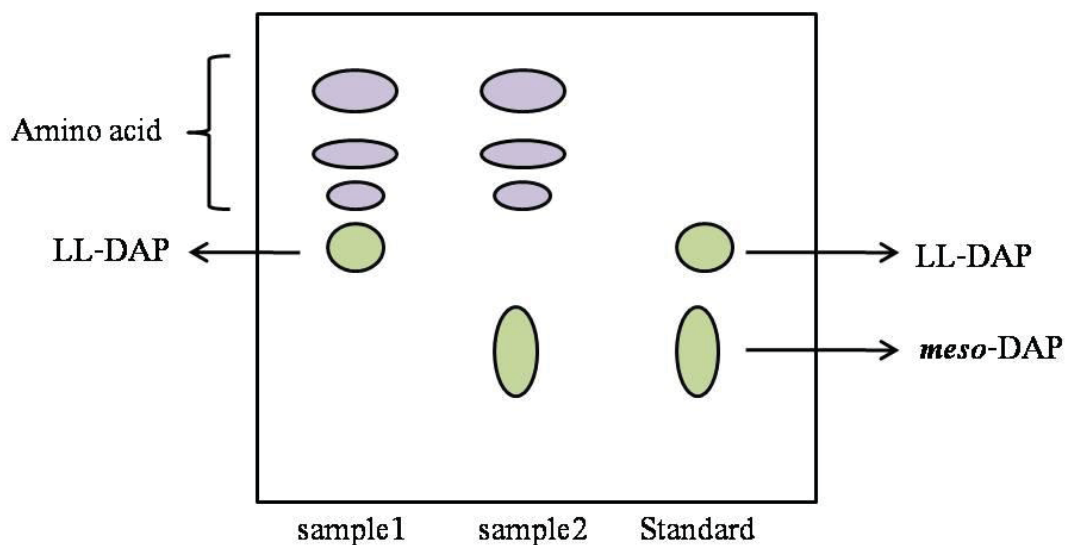


ก



ข

ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด *meso*-isomer ของแอคติโนมัยซีทผนัง
เซลล์กลุ่มที่ II (ก) ผนังเซลล์กลุ่มที่ III และกลุ่มที่ IV (ข) M = NAM และ G = NA (Kudo, 2008)



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะ โครมาโทกราฟฟีที่ได้จากการวิเคราะห์ผนังเซลล์แอคติโนมัยซีท

(Becker *et al.*, 1965)

Cummins และ Harris (1956) ได้แบ่งกลุ่มแอคติโนมัยซีทตามชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ไว้ทั้งหมด 8 กลุ่มดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอคติโนมัยซีท

Major constituent	Chemotype							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII
L-Diaminopimelic acid	+							
meso-Diaminopimelic acid		+	+	+				
Diaminobutyric acid							+	
Aspartic acid						v		
Glycine	+	+					+	
Lysine					+			
Ornithine					+			+
Arabinose				+				
Galactose				+		v		

หมายเหตุ v, variable; +, present; -, absent

2.4.2.2. ชนิดน้ำตาลภายในเซลล์

ชนิดน้ำตาลภายในเซลล์เป็นข้อมูลสำคัญในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีท เช่นเดียวกับไอโซเมอร์ของ DAP การศึกษาชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ในการแยกความแตกต่างของน้ำตาลภายในเซลล์ โดยใช้ n-บิวทานอล: น้ำ: ไพริดีน: โทลูอิน ในอัตราส่วน 5: 3: 3: 4 (v/v) เป็น mobile phase

ในการแยกรูปแบบของน้ำตาลภายในเซลล์ของแอคติโนมัยสีทที่มี diaminopimelic ชนิด *meso* ไอโซเมอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 5 แบบดังตารางที่ 2 พบว่าน้ำตาลชนิด madurose (3-O-methyl-D-galactose) ซึ่งมีความสำคัญต่อการจำแนกแอคติโนมัยสีทบางสกุล เช่น *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Spirillospora* และ *Microbispora* (Lechevalier และ Lechevalier, 1981)

ตารางที่ 2 ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ของแอคติโนมัยสีทที่มี diaminopimelic ชนิด *meso* ไอโซเมอร์ (Lechevalier และ Lechevalier, 1981)

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

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

Labeda (1986) ได้มีการเสนอการแบ่งกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะส่วนประกอบของผนังเซลล์ คือ diaminopimelic acid isomer (DAP) และ whole-cell sugar ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางและใช้เป็น taxonomic markers (ตารางที่ 3) โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อใช้แยกความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ (cell wall type) คือ LL และ *meso* isomer ของ diaminopimelic acid (DAP) และความแตกต่างขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์ (whole cell sugar pattern) เช่น galactose, arabinose, xylose, mannose, glucose, และ ribose เป็นต้น

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมี
ของเซลล์ (Labeda, 1986)

Type I cell wall

- Streptomyces* – chains of conidia on aerial mycelium.
Streptoverticillium – chains or umbels of conidia on verticils formed on aerial mycelium.
Nocardioideis – substrate and aerial mycelium fragment into coccoid elements.
Actinopycnidium – same as *Streptomyces* but pycnidia-like structures formed.
Actinosporangium – same as *Streptomyces* but spores accumulate in drops.
Chainia – same as *Streptomyces* but sclerotia are also formed.
Elytrosporangium – same as *Streptomyces* but merosporangia are also produced on vegetative mycelium.
Intrasporangium – no aerial mycelia; substrate mycelium forms vesicles.
Microellobosporia – merosporangia produced on both aerial and substrate mycelia.
Sporichthya – no substrate mycelium; aerial chains of motile conidia held to surface of substrate by holdfasts.
Kitasatoa – single spores in sporangia on aerial and substrate mycelia; spores motile.

Type II cell wall

- Micromonospora* – no aerial mycelium; single conidia produced.
Actinoplanes – globose-to-lageniform sporangia; motile spores.
Amorphosporangium – same as *Actinoplanes* but irregular sporangia; spores generally non-motile.
Ampullariella – lageniform-to-globose sporangia; motile rod-shaped spores.
Dactylosporangium – claviform sporangia containing one chain of motile spores.
Glycomyces – aerial mycelium with chains of non-motile conidia.

Type III cell wall

- No characteristic whole cell sugars
Actinosynnema – synnemata with chains of motile conidia.
Geodermatophilus – hyphae divide in all planes, forming packets of motile coccoid conidia.
Nocardiopsis – long chains of conidia on aerial mycelium.
Thermomonospora – single conidia formed on aerial and substrate mycelia.
Thermoactinomyces – single heat-resistant endospores produced on aerial and substrate mycelium.

Madurose as characterisitic whole cell sugar

- Actinomadura* – short chains of conidia on aerial mycelium.
Dermatophilus – same as *Geodermatophilus*.
Exellospora – short chains of conidia on aerial and substrate mycelia.
Microbispora – longitudinal pairs of conidia on aerial mycelium.
Microtetraspora – chains of four to six conidia on aerial mycelium.
Planobispora – cylindrical sporangia, each containing two motile spores.
Planomonospora – cylindrical sporangia, each containing one motile spore.
Spirillospora – globose sporangia with rod-shaped motile spores.
Streptosporangium – globose sporangia with nonmotile spores.

Rhamnose and galactose as characteristic whole cell sugars

- Saccharothrix* – long chains of conidia on aerial mycelium.

Type IV cell wall

- Nocardia* – abundant filamentation, often fragmenting into coccoid rods; aerial mycelium and chains of conidia sometimes formed.
Actinopolyspora – long chains of conidia on aerial mycelium; substrate mycelium may fragment.
Amycolata – abundant filamentation, chains of conidia formed on aerial mycelium; substrate mycelium may fragment.
Amycolatopsis – same as *Amycolata*.
Micropolyspora – short chains of conidia formed on aerial and substrate mycelia.
Faenia – same as *Micropolyspora*.
Pseudonocardia – long, cylindrical conidia formed on aerial mycelium, dividing into shorter coccoid elements.
Saccharomonospora – single spores primarily on aerial mycelium.
Saccharopolyspora – similar to *Nocardiopsis*.
Kibdelosporangium – chains of conidia produced on aerial mycelium; sporangia-like structures also produced.

Type X cell wall (cell walls contain glycine and *meso* and *L* isomers of DAP).

- Kitasatosporia* – long chains of conidia produced on aerial mycelium.

2.4.2.3 Phospholipid

Phospholipid เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเยื่อเยื่อและรูปร่างของเยื่อเยื่อ phospholipid แสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ และบริเวณที่ชอบน้ำในโมเลกุล มีนอกจากนี้ phospholipid มีความสำคัญในการจำแนกแอกติโนมัลลิตในระดับสกุล แบ่งเป็น 5 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอกติโนมัลลิต (Lechevalier *et al.*, 1977)

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

หมายเหตุ v , variable; + , present; - , absent; PIM, phosphatidylinositolmannosides; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholin; PG , phosphatidylglycerol; PE , phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidylmethylethanolamine; GluNU, unknown glucosamine-containing phospholipids; APG, acyl phosphatidylglycerol และ DPG, diphosphatidylglycerol

ในปี 1981 Lechevalier และคณะ ได้จัดรูปแบบของ phospholipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ดังนี้

PI ประกอบด้วย phospholipid แทบทุกชนิดยกเว้น phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE), OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylcholine (PC) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)

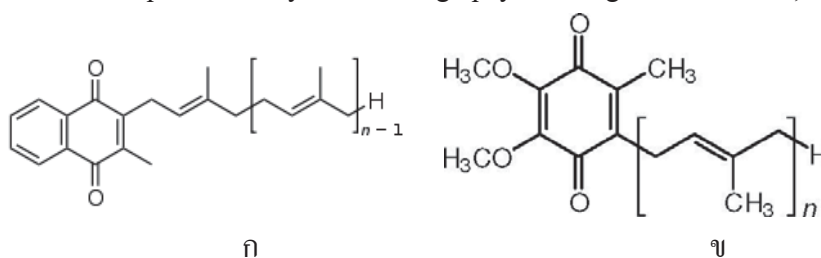
PII ประกอบด้วย phosphatidylethanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE) และ OH- phosphatidylethanolamine (OH-PE) เป็นหลัก แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIII ประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) เป็นหลักอาจจะมีหรือไม่มี phosphatidyletanolamine (PE) แต่ไม่มี phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIV ประกอบด้วย phosphatidyletanolamine (PE) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

2.4.2.4 isoprenoid quinones

isoprenoid quinones อยู่ในพลาสมาเมมเบรนของแบคทีเรียและมีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ quinones พบในเซลล์ของแบคทีเรียที่ต้องการเจริญเติบโต isoprenoid quinones ในแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ menaquinone และ ubiquinone (ภาพที่ 5) จำนวนหน่วยของ isoprene และระดับการเกิดปฏิกิริยา hydrogenation ของพันธะคู่ของสาย isopenyl สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรีย การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณหน่วยของ isoprene นิยมใช้ high-performance liquid chromatography (HPLC) และ reverse-phase thin layer chromatography (Komagato และ Suzuki, 1987)



ภาพที่ 5 แสดง isoprenoid quinones ที่พบในแบคทีเรีย ก) menaquinone, ข) ubiquinone

2.4.3 ลักษณะทางจีโนไทป์

ลักษณะทางจีโนไทป์ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ สารพันธุกรรมของแบคทีเรียประกอบด้วย DNA และ RNA โดย RNA มี 3 ชนิด ได้แก่ mRNA, tRNA และ rRNA ในปัจจุบัน rRNA เข้ามามีบทบาทในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยอาศัยความเหมือนและความต่างของลำดับเบส การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรงซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้ง 4 ชนิด (A, T, C และ G) ที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอซึ่งสามารถบอกถึงการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการ transversion transition silent หรือการเลือกของยีน และยังใช้เป็นเครื่องหมายระดับ nucleotide base (Takamustsu *et al.*, 1999) การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทาง phylogenetic

แอกติโนมัยซีทมีไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA; rRNA) ประมาณ 80% มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนร่วมกับไรโบโซมอลของโปรตีนหลายชนิด ไรโบโซมมีขนาด 70s ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อย 50s ซึ่งประกอบด้วย rRNA ชนิด 5S และ 23S ขนาดประมาณ 120 กิโลเบส และ 3 กิโลเบสตามลำดับ ส่วนหน่วยย่อย 30S ซึ่งโปรตีนอยู่ร่วมกับ rRNA ชนิด 16S ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (Lewin, 2000) โครงสร้างทุติยภูมิของ 16s rRNA ประกอบด้วย “stem and loop” ประมาณ 50 ชุด (Pernodet *et al.*, 1989) มีความสามารถในการจับกับโปรตีนจำเพาะหลายชนิดเพื่อรวมกันเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม หน่วยย่อย 30S ส่วนปลายสุดทางด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA มีลำดับเบส 6 เบส คือ 5'-CCUCCU-3' ทำหน้าที่เกาะลำดับชายน์-ดัลกาโน (Shine-Dalgarno sequence) ตรงบริเวณปลาย 3' ของ mRNA ซึ่งอยู่ตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น AUG ประมาณ 7 เบส ส่วนปลาย 3' major domain มีหน้าที่จับกับ initiation factor 3 (IF3) โดยการเกิดปฏิกิริยาคลอสลิงค์ (cross-link) ระหว่างโปรตีนกับอาร์เอ็นเอ ในขณะที่อาร์เอ็นเอในไรโบโซม 50S ซึ่งเกาะอยู่กับโปรตีนจำเพาะเช่นกัน ทำหน้าที่จับบริเวณปลาย 3'-CCA ของ tRNA และตำแหน่งจับกับ elongation factor G และ Tu (Lewin, 2000)

2.5 แอกติโนมัยซีทหายาก (Rare actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทหายาก หรือ Rare actinomycetes (non-*Streptomyces* group) คือ แอกติโนมัยซีทนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces* แอกติโนมัยซีทหายากประกอบด้วย 5 แฟมิลี ได้แก่ *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Thermomonosporaceae* และ Other (unclassified) species

1. แฟมิลี *Micromonosporaceae*

แฟมิลี *Micromonosporaceae* ประกอบด้วยสกุล *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactlosporagium*, *Pilimelia*, *Catenuloplanes*, *Couchiplanes*, *Catellotospora* ซึ่งอธิบายโดย Stackebrandt และ คณะในปี 1997 นอกจากนี้ยังมี *Spirilliplanes* (Tamura, 1977) และ *Verrucosispora* (Rheims *et al.*, 1998) (ตารางที่ 5)

2. แฟมิลี *Streptosporangiaceae*

แฟมิลี *Streptosporangiaceae* ประกอบด้วยสกุล *Amorphosporangium*, *Ampullariella*, *Dactylosporagium*, *Kitasatoa*, *Pilimelia*, *Planobispora*, *Planomonospora* และ *Spirillospora* (Couch and Bland, 1974) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของสกุลต่างๆของแฟมิลี *Micromonosporaceae*. (Stackebrandt *et al.*, 1997; Tamura, 1970)

Genus	G+C Content of DNA (mol%)	Motility of spore	Spore-chain	Fatty acid type ^b	Cell wall type ^c	Major menaquinone(s)	Phospholipid type ^d	Characteristic sugar(s)	Whole cell
<i>Longispore</i>	70	-	+	2d	II	MK-10(H ₄ , H ₆)	P II	Xyl, Ara, Gal	meso-DAP
<i>Virgosporangium</i>	71	+	-	2d	II	MK-10(H ₄ , H ₆)	P II	Xyl, Ara, Gal	meso-DAP
<i>Asana</i>	71-72	-	+	2d	II	MK-10(H ₄ , H ₆)	P II	Xyl, Ara, Gal	meso-DAP
<i>Actinoplanes</i>	72-73	+	+	-	2d	II	MK-9(H ₄), MK-10(H ₄)	P II	Xyl, Ara, meso-DAP
<i>Spirilliplanes</i>	69	+	+	2d	II	MK-10(H ₄)	P II	Xyl, Gal	meso-DAP
<i>Micromonospora</i>	71-73	-	-	3b	II	MK-10(H ₄ , H ₆), MK-9(H ₄ , H ₆)	P II	Ara, Xyl	meso-DAP
<i>Dactylosporangium</i>	72-73	+	-	3b	II	MK-9(H ₄ , H ₆ , H ₈)	P II	Ara, Xyl	meso-DAP
<i>Catellatospora</i>	71-72	-	+	3b	II	MK-10(H ₄ , H ₆), MK-9(H ₄ , H ₆)	P II	Xyl	Xyl, Ara, Gal/Xyl only meso-DAP
<i>Catenuloplanes</i>	71-73	+	+	2c	VI	MK-9(H ₄), MK-10(H ₄)	P II	Xyl	L-Lys
<i>Couchioplanes</i>	70-72	+	+	2c	VI	MK-9(H ₄)	P II	Xyl, Ara, Gal	L-Lys
<i>Pilimelia</i>	ND	+	-	2d	II	MK-9(H ₂ , H ₄)	P II	Ara, Xyl	meso-DAP
<i>Verrucosipora</i>	70	-	-	2b	II	MK-9(H ₄)	P II	Man, Xyl	meso-DAP

^a +, present; -absent; ND, not determined.

^b According to the classification of Kroppenstedt (1985).

^c According to the classification of Lechevalier and Lechevalier (1977).

^d According to the classification of Lechevalier *et al.*, 1970.

Abbreviation: Xyl, xylose; Gal, galactose; Ara, arabinose.

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของสกุลต่างๆของแฟมิลี Streptosporangiaceae (Goodfellow, 1989a, b; Goodfellow *et al.*, 1990 ; Kroppenstedt *et al.*, 1990 ; Kudo *et al.*,1993 and Tamura *et al.* 2000).

Characteristics	Genus								
	<i>Acrocarpospor</i>	<i>Herbidospora</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Microtetraspora</i>	<i>Nonomuraea</i>	<i>Planobispora</i>	<i>Planomonospora</i>	<i>Planotetraspora</i>	<i>Streptosporangium</i>
Vesicle formation	Club or globos spore vesicles on aerial hyphae	Spore chains on aerial hyphae	Spores in characteristic longitudinal pairs on aerial hyphae	Spore chains containing four or more spores on short aerial hyphae	Spore chains or pseudosporangia formed on aerial hyphae	Cylindrical to clavate spore vesicles containing longitudinal pairs of spores on aerial hyphae	Cylindrical to clavate spore vesicles containing single spores on aerial hyphae	Spore vesicles containing four spores on aerial hyphae	Globose spore vesicles on aerial hyphae
Motile spores	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Cell-wall	III	III	III	III	III	III	III	III	III
chemo-type ^a									
Whole-organism sugar pattern ^b	B, C	B	B, C	B, C	B, C	B	B	D, A	B
Fatty-acid type ^c	3c	3c	3c	3c	3c	3c	3c	ND	3c
Major	-9[H ₂ , H ₄ , H ₆]	-10[H ₄ , H ₆ , H ₈]	-9[H ₆ , H ₂ , H ₄]	-9[H ₂ , H ₄ , H ₆]	-9[H ₆ , H ₂ , H ₄]	-9[H ₂ , H ₄]	-9[H ₂]	ND	9[H ₄]
Menaquinones (MK) ^d									
Phospholipid type ^e	IV, II	IV	IV	IV	IV	IV	IV	ND	IV

หมายเหตุ⁺, present; -, absent; and ND, not determine

3. แฟมิลี *Pseudonocardiaceae*

แฟมิลี *Pseudonocardiaceae* ประกอบด้วยสกุล *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, และ *Saccharomonospora* (Bowen *et al.*, 1989; Embley *et al.*, 1988a, b)

4 แฟมิลี *Thermomonosporaceae*

แฟมิลี *Thermomonosporaceae* ประกอบด้วยสกุล *Actinomadura* (Lechevalier และ Lechevalier, 1970a), *Actinocorallina* (Iinuma *et al.*, 1994), *Spirillospora* (Couch, 1963) และ *Thermomonospora* (Henssen, 1957)

5. แฟมิลี other (unclassified) species

แฟมิลีอื่นๆ ประกอบด้วยสกุล *Frankia* และ *Salinispora* ในประเทศไทยมีรายงานการพบสปอร์ใหม่ของแอคติโนมัยซีทหลายสกุลได้แก่ สกุล *Micromonospora* (Thawai *et al.*, 2004, 2005a, b, 2007, 2008; Jongrungranchok *et al.*, 2008) และ สกุล *Microbispora* (Nakajima *et al.*, 1999) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 สกุล *Micromonospora*

สกุล *Micromonospora* มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอมี ประมาณ 71–73 mol% (Vobis, 1989) สกุลนี้สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ มีผนังเซลล์แบบที่ II น้ำตาลภายในเซลล์รูปแบบ D phospholipid เป็นแบบที่ II สร้างเฉพาะเส้นใยอาหารแต่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สีของโคโลนี ได้แก่ pale yellow to light orange, becoming deep orange, red, purple, brown และ blue-green ขึ้นอยู่กับอายุหรือสายพันธุ์ แล้วเปลี่ยนเป็นเมือกสีดำ (Kawamoto, 1989) มีการสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร สปอร์ที่สร้างเป็นรูปไข่ มีขนาด 0.7-1.5 ไมโครเมตร เจริญที่ความเป็นกรดต่ำกว่า 6 เจริญที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Holt, 1989) เจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl 1.5-5% แต่ส่วนมากเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 3% ทุกสายพันธุ์สามารถย่อยเจลาตินได้ ผนังเซลล์ประกอบด้วย glycine, glutamic acid, *meso*-diaminopimelic acid (*meso*-DAP) และ D-alanine พบน้ำตาล pentose, xylose และ arabinose ในผนังเซลล์ ส่วน hexose, glucose และ galactose พบน้อยกว่า mannose และ rhamnose ส่วน phospholipid ที่พบในผนังเซลล์ได้แก่ diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositolmannosides และ phosphatidylethanolamine แต่ไม่พบ phosphatidylcholine กรดไขมันที่พบบ่อยที่สุด คือ iso- และ anteiso-branches fatty acids บางสายพันธุ์พบกรดไขมันชนิด 10-methylated fatty acids หรือ unsaturated fatty acids (iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, iso-C_{17:0}, C_{17:0} และ anteiso- C_{17:0}) รูปแบบของกรดไขมันคือ 3b (Kroppenstedt, 1985) เชื้อสกุลนี้สามารถย่อยสลายไคติน เซลลูโลส และ ลิกนิน สามารถพบในดิน รากพืช น้ำพุ แม่น้ำ โคลนทะเลสาบ ตะกอนแม่น้ำ ชายหาด ฟองน้ำ สิ่งแวดล้อมในทะเล และในตะกอนทะเล (Berdy, 2005; Rifaat, 2003; Jansen *et al.*, 2005a,b, Eccleston *et al.*, 2008)

สกุล *Micromonospora* ประกอบด้วย 15 สปีชีส์ ยกเว้น *M. gallica* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มโดยอาศัยองค์ประกอบของ menaquinones เป็นหลัก คือ MK-9, MK-10 และ MK-12 สปีชีส์ที่มี menaquinones ชนิด MK-9 เป็นหลัก ได้แก่ *M. carbonacea*, *M. halophytica*, *M. nigra* และ *M. chersina* แต่สปีชีส์ที่มี menaquinones ชนิด MK-12 เป็นหลักมีเพียง 1 สปีชีส์ คือ *M. pallida* ส่วนที่มี menaquinones ชนิด MK-10 เป็นหลัก ได้แก่ *M. chalcea*, *M. insitola*, *M. coerulea*, *M. purpureochomogenes*, *M. oliversterospora*, *M. echinospora*, *M. matsumotoense*, *M. rosaria* และ *M. aurantica*

สกุล *Micromonospora* มีหลายสปีชีส์ยกตัวอย่างเช่น *M. coriariae*, *M. endolithica* DSM 44398^T, *M. chersina* DSM 44151^T, *M. rosaria* DSM 803^T, *M. inositola* DSM 43819^T, *M. fulviridis* DSM 43906^T, *M. echinospora* DSM 43816^T, *M. sagamiensis* DSM 43912^T, *M. inyoensis* DSM 46123^T, *M. saelicesensis* และ *M. lupini* sp เป็นต้น (ตารางที่ 7)

ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Micromonospora* ได้แก่ *M. anrantionigra* (Thawai et al., 2004), *M. eburnean* (Thawai et al., 2005a), *M. siamensis* (Thawai et al., 2005b), *M. narathiwaensis* (Thawai et al., 2007), *M. pattaloonggenesis* (Thawai et al., 2008), *M. chaiyaphumensis* (Jongrungranchok et al., 2008a), *M. krabienensis* (Jongrungranchok et al., 2008b), *M. marina* (Tanasupawat et al., 2010) และ *M. humi* (Songsumanus et al., 2011)

ตารางที่ 7 ลักษณะของสกุล *Micromonospora* สปีชีส์ต่างๆ (Trujillo *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2007)

Charecteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Color of substrate mycelium (on ISP2 medium)	Intense orange	Orange	Light orange	Orange- brown	Orange	Salmon- orange	Purple	Coral red	Yellow- olive		
Diffusible pigment	-	-	Fluorescent	Wine red	-	-	-	-	-	Light	-
NaCl tolerance (%)			yellow							orange	
Maximum growth temperature (°C)	1	7	3	ND	1.5	ND	3	ND	ND	2	1
Nitrate reduction	37	39	49	42	40	ND	37	ND	ND	37	37
Xylan hydrolysis											
Carbon sources	+	-	v	-	-	ND	v	ND	ND	-	-
Gluconate	+	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	+
Rhamnose											
Sucrose	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Main	+	-	-	+	-	-	+	-	(+)	-	-
	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	MK-10(H ₄)	MK-10(H ₄)	MK-9(H ₄)	MK-10(H ₄)	MK-10(H ₄)	MK-9(H ₄)	MK-	MK-9(H ₄)	MK-10(H ₄)	MK-10(H ₄)	MK

ตารางที่ 7 ลักษณะของสกุล *Micromonospora* สปีชีส์ต่างๆ (ต่อ)

Charecteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
menaquinone						10(H ₄)		MK-10(H ₆)	10(H ₄)		
Whole-cell sugar*									MK-10 (H ₆)		MK-9 (H ₄)
	Glc, Xyl, Ara, Man, Rib	Gal, Ara, Xyl, Rib Rha	Glc, Man, Xyl, Ara	Ara, Xyl, Gal	ND	Xyl, Glc	Xyl, Glc, Xyl, Glc	Xyl, Glc, Xyl, Glc	Ara	Glc, Man, Man, Ara, Xyl, Ara, Rib, Rha Xyl, Rib	

หมายเหตุ +, present; -, absent; and ND, not determine; 1, *M. coriariae*; 2, *M. endolithica* DSM 44398^T; 3, *M. chersina* DSM 44151^T; 4, *M. rosaria* DSM

803^T; 5, *M. inositol* DSM 43819^T; 6, *M. fulviridis* DSM 43906^T; 7, *M. echinospora* DSM 43816^T; 8, *M. sagamiensis* DSM 43912^T; 9, *M.*

2.5.2 สกุล *Microbispora*

สกุล *Microbispora* อยู่ในแฟมิลี *Streptosporangiaceae* (Nonomura และ Ohara, 1957) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ เป็นแอคติโนมัยสิตที่เคลื่อนที่ไม่ได้ สร้างสปอร์คู่บนเส้นใยอากาศ สปอร์มีรูปร่างไข่ เส้นใยอาหารมีสี pinkish to brownish red บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้ เส้นใยอาหารมีขนาด 0.5-0.8 ไมโครเมตร สปอร์มีขนาด 1.2-1.6 ไมโครเมตร ผิวของสปอร์เป็นผิวเรียบ

ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-diaminopimelic acid , glutamic acid และ alanine ซึ่งเป็นผนังเซลล์ชนิดที่ III น้ำตาลภายในเซลล์เป็นชนิด B และ C phospholipid ในเซลล์ประกอบด้วย phosphatidyletanolamine และ ninhydrin-positive glycolipid บ่งบอกว่าเป็น phospholipid ชนิดที่ IV menaquinone ชนิดหลัก คือ MK-9 ปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอมี ประมาณ 71–73 mol%

สกุล *Microbispora* มีหลายสปีชีส์ยกตัวอย่างเช่น *Mb. aerate* *Mb. amethystogenes* *Mb. crhomogenes* *Mb. corallina* *Mb. indica* *Mb. karnatakensis* *Mb. mesophilica* *Mb. purva* *Mb. rosea* *Mb. thermidisastatica* *Mb. thermosea* เป็นต้น (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ลักษณะของสกุล *Microbispora* สปีชีส์ต่างๆ (McCarthy and Cross, 1984; Rao *et al.*, 1987; Nonomura 1989a and Nakajima *et al.*, 1999)

Characteristics	<i>Mb. aerate</i>	<i>Mb. anethystogenes</i>	<i>Mb. chromogenes</i>	<i>Mb. corallina</i>	<i>Mb. indica</i>	<i>Mb. kamatakensis</i>	<i>Mb. mesophilica</i>	<i>Mb. purva</i>	<i>Mb. rosea</i>	<i>Mb. thermodisastatica</i>	<i>Mb. thermosea</i>
Morphology											
Aerial	Pink	Pink	Pink	Pink	Pinkish-white	White	White	Pink	Pale pink	Pink	Pink
Mycelium											
Substrate	Yellowish	Light Brown	Orange	Coral	Violet-orange	Yellowish pink	Brown	Light Brown	Orange	Yellowish Brown	Yellowish Brown
Colour	Brown			to reddish pink							
Soluble	None	-	Light-brown	-	Deep orange yellow	Deep orange yellow	-	-	-	-	-
Pigment											
Indinin	+	+	-	-	-	-	ND	+	-	-	-
Production											
Degradation of Hypoxanthine	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Starch	+	-	+	V	-	-	+	-	-	+	-
Testosterone	-	-	+	ND	+	+	ND	+	+	+	-
Xanthine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Xylan	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	+	-	+	+	+	-	Data missing	-	-

ตารางที่ 8 ลักษณะของสกุล *Microbispora* สปีชีส์ต่างๆ (ต่อ)

Characteristics	<i>Mb. aerate</i>	<i>Mb. anethystogenes</i>	<i>Mb. chromogenes</i>	<i>Mb. corallina</i>	<i>Mb. indica</i>	<i>Mb. karnatakensis</i>	<i>Mb. mexophila</i>	<i>Mb. purva</i>	<i>Mb. rosea</i>	<i>Mb. thermophilastatica</i>	<i>Mb. thermosea</i>
Growth on sole carbon source (1%, w/v)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Inositol	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Growth at 25°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50°C	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
55°	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Requirement for biotin	+	-	+	-	+	-	ND	-	+	+	+
Thiamone	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+

หมายเหตุ + , present;- ,absent; and ND, not determine

2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากแอคติโนมัยสีทหายาก

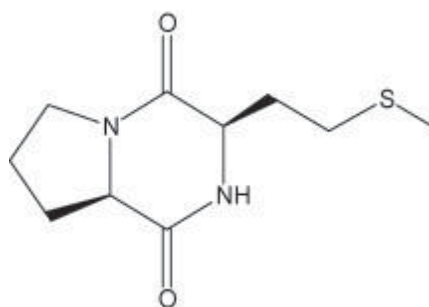
แอคติโนมัยสีทเป็นแหล่งสำคัญของสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคหลายชนิด ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของแอคติโนมัยสีทที่พบในดินส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของสารทุติยภูมิที่พบในจินัสนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค (Boudemagh, *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า rare actinomycetes สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะ สกุล *Micromonospora*, *Actinomadura* และ *Streptosporangium*

Boudemagh และคณะ (2005) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยสีท 27 สายพันธุ์จากดิน (saharian soils) ที่เก็บได้จากทิศตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอัลจีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* UMIP48.72, *C. albicans* UMIP 884.65, *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81, *Aspergillus fumigatus* UMIP1082.74, *Aspergillus niger* ATCC 16404 และ *Fusarium oxysporum* UMIP 625.72. โดยใช้วิธี agar diffusion method

Sanglier และคณะ (1993) รายงานว่า สกุล *Spirillospora* และ *Nocardioides* สร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่ม polyenes ที่ภายในโมเลกุลของสารประกอบด้วย chromophore

จากรายงานการแยกแอคติโนมัยสีทจำนวน 25 สายพันธุ์ จากน้ำ ดิน และเปลือกต้นของพืชที่อยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอัลจีเรียพบว่า แอคติโนมัยสีทเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar cylinder method โดยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ยีสต์ (yeast) และราเส้นใย (filamentous fungi) ทั้งนี้ในจำนวน 25 สายพันธุ์ พบว่า 14 สายพันธุ์ สามารถต้านแบคทีเรียได้อย่างน้อย 1 ชนิด และ 2 สายพันธุ์ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity) เมื่อศึกษาด้วย universal PCR พบว่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของ แอคติโนมัยสีทเหล่านี้จัดอยู่ในจินัส *Streptomyces* และอีก 7 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในจินัส *Actinomadura* (Kitouni *et al.*, 2005)

มีรายงานการพบ cyclo-(L-Pro-L-Met) (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่แยกได้จาก fermentation broth ของ แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล คือ *Nocardiopsis* sp. 03N67 (Shin *et al.*, 2010) โดยพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ (anti-angiogenesis activity) โดยมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อผนังสายสะดือของเด็กทารก (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ cyclo- (L-Pro-L-Met) (Shin *et al.*, 2010)

มีรายงานการค้นพบ sannastatin (Yang *et al.*, 2011) (ภาพที่ 7ก) จาก *Streptomyces sannanensis* ซึ่งพบในอุจจาระของแพนด้ายักษ์ (*Ailuropoda melanoleuca*) ซึ่งเป็นสารใหม่ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น 20-membered macrocyclic lactam ภายในโมเลกุลประกอบด้วย diene conjugated olefin สารที่มีโครงสร้างเช่นนี้จัดเป็นสารที่พบได้ยากในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบสารอื่นที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกัน คือ vicensistatin (ภาพที่ 7ข) และสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านไร้น้ำเค็มหรือไร้น้ำตาล (brine shrimp, *Artemia salina*) (Yang *et al.*, 2011)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Lab-scan, U.S.A)
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Merck, Germany)
3. แอลกอฮอล์ 99 เปอร์เซ็นต์ (ethanol) (Fluka, U.S.A)
4. กลีเซอรอล (glycerol) (Fluka, U.S.A)
5. เมนิทอล (manitol) (Difco)
6. ดี-ไรโบส (D-ribose) (Sigma, U.S.A.)
7. แอล-แรมโนส (L-rhamnose) (Sigma, U.S.A.)
8. ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) (Sigma, U.S.A.)
9. ดี-ราฟฟิโนส (D-raffinose) (Sigma, U.S.A.)
10. ดี-ไซโลส (D-xylose) (Sigma, U.S.A.)
11. ซาลิซิน (salicin) (Sigma, U.S.A.)
12. แลคโตส (Lactose) (Merck, Germany)
13. กาแลคโตส (galactose) (Merck, Germany)
14. แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) (Sigma, U.S.A.)
15. เซลโลไบโอส (cellubiose) (Sigma, U.S.A.)
16. ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) (Merck, Germany)
17. ซูโครส (sucrose) (Merck, Germany)
18. อินนอร์ซิทอล (inositol) (Sigma, U.S.A.)
19. แมนโนส (mannose) (Sigma, U.S.A.)
20. ไอโอดีนบรียัท (Merck, Germany)
21. กรดซัลฟานิก (sulfanic acid) (Fluka, U.S.A)
22. ไดเมทิลเนปทิลลามีน (*N,N*-diamethyl-1-naphtylamine) (Fluka, U.S.A)
23. เมทานอล (methanol) (Merck, Germany)
24. ไพริดีน (pyridine)

25. นินไฮดริน (ninhydrin)
26. เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) (Merck, Germany)
27. คลอโรฟอร์ม (chloroform) (Merck, Germany)
28. กรดอะซิติก (acetic acid) (Fluka, U.S.A)
29. กรดซัลฟูริก (sulfuric) (Merck, Germany)
30. อะซีโตน (acetone) (Merck, Germany)
31. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Merck, Germany)
32. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) (Sigma, U.S.A.)
33. ฟีนอล (phenol) (Fluka, U.S.A)
34. ไคคลอโรมีเทน (Merck, Germany)
35. ไซโคลเฮกซามายด์ (cyclohexamide) (Fluka, U.S.A)
36. ไนสแตติน (nystatin) (Fluka, U.S.A))
37. แอล-โพลีน (Sigma, U.S.A.)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหิดแห้ง
2. เครื่องผสมสาร
3. ออโตปีเปต
4. หลอดทดลอง
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. ตู้อบลมร้อน
9. ตู้แช่แข็ง
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
11. กล้องจุลทรรศน์
12. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
13. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ
14. เครื่องเขย่า

15. ตุ่มเชื้อ

3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
2. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
5. *Escherichia coli* ATCC 25922
6. *Candida albican* ATCC 10231
7. *Ralstonia solanacearum*
8. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

4. ตัวอย่างที่แยกแอกติโนมัยสัทหายาก

รากและดินหน่อไม้ฝรั่งจากสวนเกษตรอินทรีย์ที่เก็บมาจากแปลงสาธิตการปลูกหน่อไม้ฝรั่งจำนวน 4 ตัวอย่างจากอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี และ อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

วิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อ

1.1 การแยกแอกติโนมัยสัทหายาก

1.1.1 การแยกเชื้อแอกติโนมัยสัทโดยการวางรากหน่อไม้ฝรั่งบนอาหาร

นำรากหน่อไม้ฝรั่งล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา วางบน plate ที่มีกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ถึง 3 วัน นำไปแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2 นาที แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ถึง 3 ครั้ง วางบนกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ถึง 3 วัน จึงนำมาวางบนอาหาร starch glycerol agar และ อาหาร water proline agar ที่มีการเติม nalidixic acid 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ cyclohexamide ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ถึง 4 สัปดาห์

1.1.2 การแยกเชื้อโดยการบดรากหน่อไม้ฝรั่งบนอาหาร

นำรากหน่อไม้ฝรั่งล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา วางบน plate ที่มีกระดาษกรอง ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ถึง 3 วัน นำไปแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2 นาที แล้วแช่ใน แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ถึง 3 ครั้ง วางบนกระดาษกรองทิ้งไว้ให้แห้ง ประมาณ 1 ถึง 3 วัน ชั่งรากหน่อไม้ฝรั่งประมาณ 0.2 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโถง เติม สารละลาย winogradsky 5 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างโดยการดูดสารละลายตัวอย่างราก 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย winogradsky 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-2} ดูดสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร starch glycerol agar และ อาหาร water proline agar ที่มีการเติม nalidixic acid 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ cyclohexamide ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ถึง 4 สัปดาห์

1.2 การแยกเชื้อ *Streptomyces* จากตัวอย่างดิน

ทำการแยกแอกติโนมัยสียจากดินบริเวณรอบรากตามที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Takahashi, *et al.* (1996) นำดินมาเจือจางตั้งแต่ 1:10-1:1,000 แล้วนำสารละลายดินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มา pour plate บนอาหาร starch-glycerol agar และอาหาร water agar proline ซึ่งเติม Benlate 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ nalidixic acid 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

2. การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีย

ทำการแยกเชื้อเฉพาะโคโลนีสีส้มที่คาดว่าจะเป็แอกติโนมัยสียหายากโดยใช้เข็มเย็บเชื้อ มาขีดลากบนอาหาร yeast extract- malt extract agar (ISP2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำมาแยกบริสุทธิ์ไว้สำหรับทำการทดสอบความสามารถ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

ทำการคัดเลือกแอกติโนมัยสียที่สามารถด้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar cross streak method (Waskman, 1940) โดยนำแอกติโนมัยสียมาขีดลากเป็นเส้นยาวบนอาหาร ISP2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็น 14 วัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งทั้ง 8 สายพันธุ์มาขีดตั้งฉากให้ชิดกับโคโลนีของแอกติโนมัยสีย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจการ สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ระหว่างโคโลนีของ แอกติโนมัยสียและเชื้อทดสอบ

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกจากข้อ 3 มาทำการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ ลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

4.1 การศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกแล้วมาขึ้นบนอาหาร ISP2 ตรวจสอบลักษณะสปอร์และการเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 การศึกษาลักษณะทางการเจริญของแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทมาขึ้นบนอาหาร yeast extract malt extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4), glycerol asparagine agar (ISP5), tyrosine agar (ISP7), basal agar medium (ISP9), glucose asparagine agar, Czpek's sucrose agar และ nutrient agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วันสังเกตการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

4.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

4.2.1 การใช้แหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหาร basal agar medium (ISP9) (ภาคผนวก ก) แล้วจึงเติม casamino acid ความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ D-manitol, D-ribose, L-rhamnose, D-melibiose, D-fructose, raffinose, glycerol, Inositol, Salicin, lactose, D-galactose, L-arabinose, Cellobiose และ D-fructose นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาขึ้นบนอาหารแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน โดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อกับชุดควบคุมเชิงลบ (อาหาร basal agar medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน) และชุดควบคุมเชิงบวก (อาหาร basal agar medium ที่มีการเติม D-glucose เป็นแหล่งคาร์บอน)

ทำการบันทึกผลดังนี้

- ก. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงลบ (+)
- ข. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงลบและเจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ ($\pm$)
- ค. เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ (-)

4.2.2 ความสามารถในการย่อยแป้ง

เตรียมอาหาร ISP4 (ภาคผนวก ก) แล้วนำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาจัดบนอาหาร (Shirling และ Gottlieb, 1966) มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน นำสารละลายไอโอดีนมาราดบนผิวอาหาร ถ้าเชื้อสามารถย่อยแป้งในอาหารได้จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

4.2.3 ความสามารถในการย่อยเจลาติน

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทเลี้ยงในอาหาร bouillon gelatin broth (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน บันทึกผลโดยการนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ้าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินในอาหารได้อาหารจะเหลว

4.2.4 ความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรด

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทเลี้ยงในอาหาร peptone KNO₃ (ภาคผนวก ก) (Arai, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน หยด salfanic acid 2 หยด และสารละลาย N, N-dimethyl-1-naphtlamine 3 หยด ถ้ามีการเปลี่ยนรูปไนเตรดเป็นไนไตรท์สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดง

4.2.5 ความสามารถในการย่อยโปรตีน

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาเลี้ยงในอาหาร skim milk (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในอาหารได้จะเปลี่ยนจากจากขุ่นเป็นใส (peptonization) หรืออาจมีการรวมกลุ่มกันหรือตกตะกอนเป็นก้อน (coagulation)

4.2.6 ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในระดับต่างๆ

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาจัดบนอาหาร ISP2 (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.2.7 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาจัดบนอาหาร ISP2 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40 และ 50 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 7 ถึง 14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.2.8 ความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง

นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาจัดบนอาหารที่มีการปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 7 ถึง 14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

4.3.1 การเตรียมเซลล์

เลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เชื้อเชื้อลงขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร ISP2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าบนความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง นำเซลล์ไปเก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) นำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

4.3.2 การวิเคราะห์ลักษณะไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ในเซลล์

นำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมใส่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล (6N HCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วนำมาแยกตะกอนออก นำสารละลายไปทำให้แห้งภายใต้เครื่องสุญญากาศที่ 60 องศาเซลเซียส ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นนำไปจุดบนแผ่น cellulose TLC นำไปจุ่มในสารละลายผสม methanol-water-6N HCl-pyridine ในอัตราส่วน 80:26:4:10 ทิ้งไว้ในตู้ทำละลายผสมเคลื่อนที่จนสุดแผ่น เป่าให้แห้ง นำแผ่น TLC มาพ่นด้วย 0.5% ninhydrin solution ทิ้งทั้งแผ่น นำไปอบที่ความร้อน 100 องศาเซลเซียส 2 ถึง 3 นาที ตรวจสอบของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐาน DAP ไอโซเมอร์ต่างๆ

4.3.3 การวิเคราะห์ isoprenoid quinones

นำเซลล์แห้ง 100 ถึง 500 มิลลิกรัมมาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม-เมทานอล อัตราส่วน 2:1 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 คืน ในที่มืด นำมากรองและทำให้แห้งในสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ละลายด้วยอะซิโตน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น silica TLC เป้าแถบยาว 5 เซนติเมตรนำไปจุ่มในตัวทำละลายเบนซีน ตรวจสอบแถบ menaquinone ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ขูดบริเวณ menaquinone ได้

ในหลอดทดลองละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองและนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

เตรียม methy ester ของกรดไขมันจากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลต์ด้วย สารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัด ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย Gas liquid chromatography (Komagata และ Suzuki, 1987)

4.3.5 การสกัด DNA

เลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เชื้อเชื้อ ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร ISP2 ที่มีการเติม glycine 0.20% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนและล้างด้วย S-EDTA 3 ครั้ง แล้วเติม S-EDTA pH 8 จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ lysozyme แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนหนืด เติม Tris-NaCl pH 9 จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1:1 โดยปริมาตร) นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสไว้ในหลอดทดลอง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลเย็น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพันสายดีเอ็นเอ ทั้งดีเอ็นเอให้แห้ง นำไปละลายในสายละลาย 0.1 standard saline citrate นำไปเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียสแล้วนำไปส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี

4.3.6 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ได้รับการคัดเลือกจากฐานข้อมูล genbank / EMBL/ DDBJ โดยใช้ bioedit software (ในวิทยานิพนธ์ใช้ CLUSTAL X 1.83) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรมใน CLUSTAL X 1.83

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสายพันธุ์ที่แยกได้

5.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร yeast extract-malt extract บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน นำอาหาร เลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกส่วนน้ำใสและตัวเซลล์ออกจากกัน

5.2 การสกัดสาร

นำส่วนน้ำใสที่แยกได้จากข้อ 5.1 มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศจะได้สารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 โดยวิธีการ agar disc diffusion นำเชื้อทดสอบมาผสมกับน้ำเกลือปรับความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard no. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบสารละลายแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนผิวหน้าอาหารแข็งด้วยวิธี aseptic technique ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการเจือจางสารสกัดหยาบ และใช้เป็นตัวควบคุมลบ (negative control) สารสกัดหยาบแต่ละชนิดจะถูกดูดซับบนแผ่นดิสก์ในปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ แผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร บรรจุสารละลายของสารสกัดหยาบในปริมาณ 30 และ 40 ไมโครลิตร (30 และ 40 มิลลิกรัม/ดิสก์ ตามลำดับ) ในขณะที่แผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บรรจุสารละลายของสารสกัดหยาบในปริมาณ 10 และ 20 ไมโครลิตร (10 และ 20 มิลลิกรัม/ดิสก์ ตามลำดับ) ทั้งนี้สำหรับสารละลายของสารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ PKB32-24 สามารถเตรียมได้เฉพาะดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บรรจุสารละลายของสารสกัดหยาบในปริมาณ 10 และ 20 ไมโครลิตร (10 และ 20 มิลลิกรัม/ดิสก์ ตามลำดับ) เท่านั้นทั้งนี้ให้แห้งแล้ววางบนผิวหน้าอาหารที่มีการทาเชื้อทดสอบและเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบคือ ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกและผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

4.1.1 การแยกแอกติโนมัยสีท

ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินรอบรากและรากหน่อไม้ฝรั่งจากแปลงเกษตรอินทรีย์จากหุบกะพง อำเภอสระใคร จังหวัดเพชรบุรี และ อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยสีทได้ 43 สายพันธุ์ โดย 18 สายพันธุ์เป็น *Streptomyces* และ 25 สายพันธุ์เป็นแอกติโนมัยสีทหายาก และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยข้อมูลของแหล่งที่แยก วันที่แยก และชื่อของสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9 แสดงการแยก *Streptomyces* จากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง

แหล่งที่แยก	วันที่แยก	Strain no
เพชรบุรี	30 มิถุนายน 2552	HP12-6, HP12-11
เพชรบุรี	14 กันยายน 2552	HP21-10-22, HP21-12-3, HP 21-12-5
เพชรบุรี	25 กันยายน 2552	HP 22, HP22-10-2, HP22-10-7, HP 22-10-9, HP22-11-4, HP 22-13-8
เพชรบุรี	5 ตุลาคม 2552	HP13-2, HP13-11, HP 13-12, HP 13-18
เพชรบุรี	6 ตุลาคม 2552	U 11-20, U 12-1, U13-5

ตารางที่ 10 แสดงการแยกแอคติโนมัยสีทหายากจากรากหน่อไม้ฝรั่ง

แหล่งที่แยก	วันที่แยก	Strain no
เพชรบุรี	4 เมษายน 2553	PKB12- 7, PKB31-9, PKB31-10, PKB31-19
ประจวบคีรีขันธ์	4 เมษายน 2553	PKB32-1, PKB32-3, PKB32-6-21, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-8, PKB32-9-1, PKB32-9-2, PKB32-10, PKB32-12, PKB32-12-21, PKB32-12-22, PKB32-13-12, PKB32-13-13, PKB32-14, PKB32-16, PKB32-17, PKB32-18, PKB32-19, PKB32-20, PKB32-22, PKB32-24

4. 1.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของแอคติโนมัยสีทหายากยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคิดเป็น 40% ส่วนที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้คิดเป็น 32% และไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้คิดเป็น 28% (ตารางที่ 11) จะเห็นว่าแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis*, *M. luteus* และ *S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*, *R. solanacearum* และ *X. axonopodis citri*) และ ยีสต์ (*C. albicans*) พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและไม่มีเชื้อใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boudjella et al. (2006) ที่รายงานว่แอคติโนมัยสีทที่แยกจากตัวอย่างดินในประเทศแอลจีเรียมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี 2 ชนิด คือ *B. subtilis* และ *Micrococcus luteus* แต่ไม่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่ยับยั้ง *Pseudomonas fluorescens* ได้เพียงเล็กน้อยและไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Streptosporangium* Sg10 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมและรูปท่อนได้ดีกว่า *E. coli*, *A. niger* และ *C. albicans* (Saadoun et al., 1999; Basilio et al., 2003)

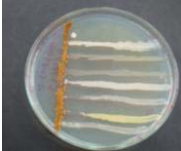
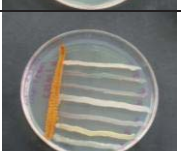
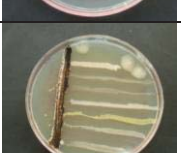
สาเหตุที่แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องมาจากความแตกต่างทางองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม และ

กลไกการออกฤทธิ์ของสารเมแทบอลิต์ที่แอคติโนมัยสิทสร้างขึ้น โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ มีผลต่อการสร้างเพปติโดไกลแคน เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นของเพปติโดไกลแคน และยับยั้ง transpeptidation เป็นต้น ทั้งนี้ชั้นของเพปติโดไกลแคนดังกล่าวเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของเพปติโดไกลแคนที่บางกว่าและมีผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่เป็น lipopolysaccharide

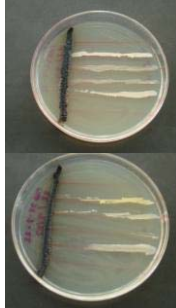
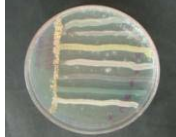
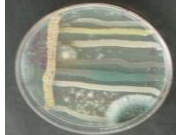
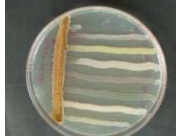
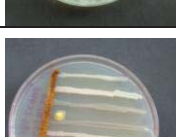
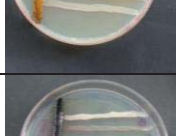
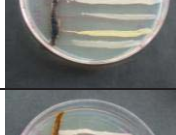
ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยสิทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้ 14 สายพันธุ์ ได้แก่ PKB12-7, PKB31-10, PKB31-19, PKB32-1, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-8, PKB32-9-1, PKB32-13-12, PKB32-13-13, PKB32-18, PKB32-19 และ PKB32-24 พบว่า 13 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Micromonospora* อีกหนึ่งสายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม *Microbispora* ไปทำการศึกษาริมาณการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีต่อไป

ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบแอคติโนมัยสิทในการยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นอยู่ในภาคผนวก

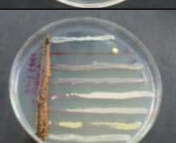
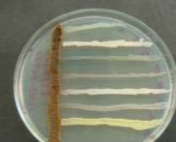
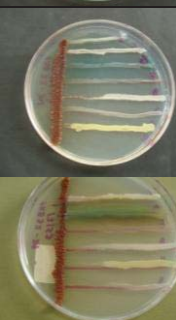
ตารางที่ 11 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น

Strain no.	ภาพการยับยั้ง	C.	PS.	E.	B.	S.	M.	R.	X.
PKB12-7		-	-	-	+i	+i	+i	ND	-
PKB31-6		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB31-10		-	-	-	+	-	+	ND	-
PKB31-19		-	-	-	+i	+i	+i	ND	-
PKB31-24		-	-	-	+++i	-	+	ND	-
PKB32-1		-	-	-	-	+	-	ND	-
PKB32-3		-	+i	+i	+i	+i	-	ND	-
PKB32-6-21		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB32-7-12		-	+i	+i	+i	+++i	+++i	ND	++
PKB32-7-21		-	-	-	+	-	+++i	ND	+i

ตารางที่ 11 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น (ต่อ)

Strain no.	ภาพการยับยั้ง	C.	PS.	E.	B.	S.	M.	R.	X.
PKB32-7-22		-	+i	-	++i	+++i	++i	++++	++
PKB32-8		-	-	-	+	-	+i	ND	-
PKB32-9-1		-	-	-	+	-	+	ND	-
PKB32-10		-	-	-	+	+i	-	ND	-
PKB32-12		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB32-12-22		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB32-13-12		-	+i	+i	+i	++i	++i	ND	+
PKB32-13-13		-	-	-	++i	+i	+i	ND	-

ตารางที่ 11 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น (ต่อ)

Strain no.	ภาพการยับยั้ง	C.	PS.	E.	B.	S.	M.	R.	X.
PKB32-14		-	-	-	++ +	+i	-	ND	-
PKB32-16		-	-	-	-	-	-	-	-
PKB32-17		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB32-18		-	+i	+i	+i	+i	+i	ND	++i
PKB32-19		-	+i	+i	++i	+i	+i	ND	-
PKB32-22		-	-	-	-	-	-	ND	-
PKB32-24		-	-	++	++i	++	+i	++	-

หมายเหตุ C, *Candida albican* ATCC 10231; PS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

E, *Escherichia coli* ATCC 25922; B, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; S, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, M, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

- ++++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) มากกว่า 50 มิลลิเมตรขึ้นไป
- +++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 41- 50 มิลลิเมตรขึ้นไป
- ++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 31 -40 มิลลิเมตร
- +++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 21-30 มิลลิเมตร
- ++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 11-20 มิลลิเมตร
- + = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 1-10 มิลลิเมตร
- = ไม่ยับยั้ง
- i = ยับยั้งแต่ยับยั้งไม่สมบูรณ์
- ND = No data

4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์แอกติโนมัยสีท

4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญของ 14 สายพันธุ์บนอาหาร YMA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันแสดงในตารางที่ 12 ดังพบว่าแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้ 13 สายพันธุ์ได้แก่ PKB12-7, PKB31-10, PKB31-19, PKB32-1, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-8, PKB32-9-1, PKB32-13-12, PKB32-13-13, PKB32-18 และ PKB32-19 จัดกลุ่มอยู่ในสกุล *Micromonospora* เนื่องจากมีโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกสีดำ สร้างสปอร์เดี่ยวบนก้านชูสปอร์สายสั้นๆ (Holt, 1989) และแอกติโนมัยสีท 1 สายพันธุ์คือ PKB32-24 ที่โคโลนีเป็นผงแห้ง เส้นใยอาหารมีสีอมชมพูจนถึงสีอมน้ำตาลแดง (pinkish to brownish red) คาดว่าจัดอยู่ในสกุล *Microbispora* (Holt, 1989) และสายพันธุ์ PKB32-9-1 ที่สามารถสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ชื่อเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	สีของเส้นใยอาหาร	สีของสปอร์	สีของรงควัตถุละลายน้ำ
PKB12-7	Mucous	Strong orange	black	-
PKB31-10	Mucous	Moderate orange	black	-
PKB31-19	Mucous	Moderate orange	black	-
PKB32-1	Mucous	Light Greenish Yellow	Brilliant yellow	-
PKB32-7-12	Mucous	Light orange	black	-
PKB32-7-21	Mucous	Brownish Black	black	-
PKB32-7-22	Mucous	Brownish Black	black	-
PKB32-8	Powdery	White	white	-
PKB32-9-1	granule	Yellowish White	Yellowish White	pink
PKB32-13-12	Mucous	Brownish Gray	black	-
PKB32-13-13	Mucous	Strong orange	black	-
PKB32-18	Mucous	Brownish Black	black	-
PKB32-19	Mucous	Brownish Gray	black	-
PKB32-24	Powdery	Deep Reddish Orange	Moderate pink	-

ทำการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทหายากรวมทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์บนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP7, ISP9, NA, Glu และ Su พบว่าเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหาร ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP7, NA และ Glu ได้ดีได้แก่ สายพันธุ์ PKB12-7, PKB32-1, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-13-12, PKB32-13-13 และ PKB32-19 ส่วนสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP7, NA และ Glu ได้ปานกลางได้แก่ PKB31-10, PKB31-19, PKB32-9-1, PKB32-18 และ PKB32-24 ส่วนอาหาร ISP9 และ Su ทุกสายพันธุ์เจริญได้น้อยยกเว้น PKB32-8

ทำการศึกษาลักษณะการเจริญแอคติโนมัยซีทหายากที่แยกจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13, PKB32-19 และ PKB32-24 เนื่องจากสามารถ

ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด พบว่าสายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 และ PKB32-19 จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* โดยดูจากสีของเส้นใยอาหารและสีของสปอร์บนอาหาร ISP2 พบว่าเส้นใยอาหารมีสี light orange, strong orange, brownish black และ brownish gray ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นเมือกสีดำ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 7)

ดังนั้นจึงจัดสายพันธุ์ PKB32-24 อยู่ในสกุล *Microbispora* โดยดูจากสีของเส้นใยอาหารและสีของสปอร์อาหาร ISP2 พบว่าเส้นใยมีสี จะเปลี่ยนจากสี deep reddish orange ไปเป็นสี moderate pink เมื่อบ่มตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น จากตารางที่ 13 พบว่า สายพันธุ์ PKB32-24 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ NA เจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP 4 สามารถได้น้อยบนอาหาร ISP3, ISP5, ISP7, ISP9, Glu และ Su

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ

Strain no	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร
PKB12-7	ISP2	ดี	Strong orange
	ISP3	ดี	Strong orange
	ISP4	ดี	Strong orange
	ISP5	ดี	Strong orange
	ISP7	ปานกลาง	Light orange
	ISP9	น้อย	white
	NA	ดี	Strong orange
	Glu	ดี	Strong orange
	Su	น้อย	white
PKB31-10	ISP2	ดี	Moderate orange
	ISP3	ปานกลาง	Strong orange
	ISP4	ปานกลาง	Light orange
	ISP5	ปานกลาง	Light orange
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray
	ISP9	ปานกลาง	Graynish Yellowish Pink
	NA	ดี	Brownish Gray
	Glu	ดี	Moderate orange
	Su	น้อย	White
PKB31-19	ISP2	ดี	Moderate orange
	ISP3	ดี	Moderate orange
	ISP4	ปานกลาง	Moderate orange
	ISP5	ปานกลาง	Light orange
	ISP7	ปานกลาง	Moderate orange
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Light orange
	Glu	ปานกลาง	Light orange
	Su	น้อย	White

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

Strain no	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร
PKB32-1	ISP2	ดี	Light Greenish Yellow
	ISP3	ดี	Light Greenish Yellow
	ISP4	ดี	Light Greenish Yellow
	ISP5	ดี	Light Greenish Yellow
	ISP7	ดี	Pale Yellow
	ISP9	ปานกลาง	Pale Yellow
	NA	ดี	Billiant Yellow
	Glu	ปานกลาง	Pale Yellow
	Su	น้อย	White
PKB32-7-12	ISP2	ดี	Light orange
	ISP3	ดี	Light orange
	ISP4	ดี	Moderate orange
	ISP5	ดี	Light orange
	ISP7	ปานกลาง	Moderate Brown
	ISP9	ดี	Graynish Reddish Orange
	NA	ดี	Moderate Brown
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White
PKB32-7-21	ISP2	ดี	Brownish Black
	ISP3	ดี	Brownish Black
	ISP4	ดี	Strong orange
	ISP5	ดี	Strong orange
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Brownish Black
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

Strain no	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร
PKB32-7-22	ISP2	ดี	Brownish Black
	ISP3	ดี	Brownish Black
	ISP4	ดี	Brownish Gray
	ISP5	น้อย	Pale Yellowish Pink
	ISP7	ดี	Brownish Black
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Brownish Black
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White
PKB32-8	ISP2	น้อย	White
	ISP3	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP4	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP5	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP7	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP9	ปานกลาง	Light greenish Gray
	NA	ปานกลาง	Light greenish Gray
	Glu	ปานกลาง	Light Granish Reddish Brown
	Su	ปานกลาง	Yellowish White
PKB32-9-1	ISP2	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP3	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP4	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP5	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP7	ปานกลาง	Light greenish Gray
	ISP9	ปานกลาง	Light greenish Gray
	NA	ปานกลาง	Light Granish Reddish Brown
	Glu	ปานกลาง	Yellowish White
	Su	น้อย	White

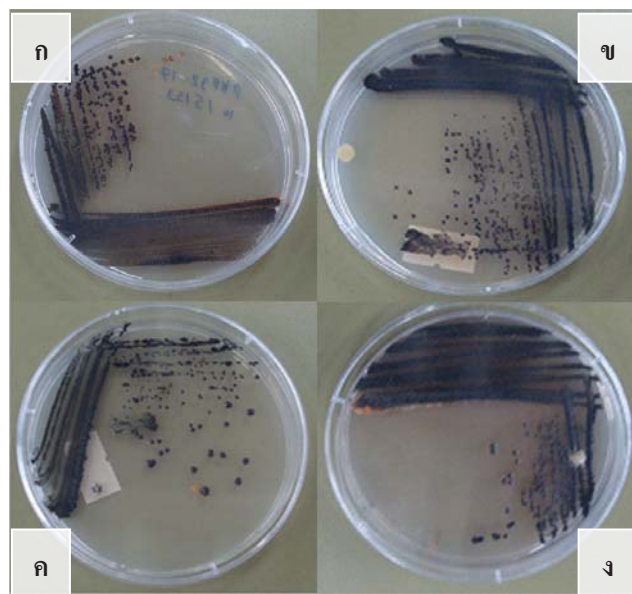
ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

Strain no	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร
PKB32-13-12	ISP2	ดี	Brownish Gray
	ISP3	ดี	Moderate Brown
	ISP4	ดี	Moderate Brown
	ISP5	ปานกลาง	Pale Yellowish Pink
	ISP7	ดี	Light orange
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Light orange
	Glu	ปานกลาง	Light orange
	Su	น้อย	White
PKB32-13-13	ISP2	ดี	Strong orange
	ISP3	ดี	Moderate Brown
	ISP4	ดี	Light orange
	ISP5	ปานกลาง	Light orange
	ISP7	ดี	Brownish Black
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Light orange
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White
PKB32-18	ISP2	ปานกลาง	Brownish Black
	ISP3	ปานกลาง	Brownish Black
	ISP4	ดี	Light orange
	ISP5	ดี	Brownish Gray
	ISP7	ปานกลาง	Brownish Gray
	ISP9	ดี	white
	NA	ดี	Brownish Gray
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ rare actinomycete บนอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

Strain no	อาหาร	การเจริญ	สีของเส้นใยอาหาร
PKB32-19	ISP2	ดี	Brownish Gray
	ISP3	ดี	Brownish Gray
	ISP4	ดี	Light orange
	ISP5	ดี	Strong orange
	ISP7	ดี	Brownish Black
	ISP9	น้อย	White
	NA	ปานกลาง	Brownish Gray
	Glu	ดี	Light orange
	Su	น้อย	White
PKB32-24	ISP2	ดี	Deep Reddish Orange
	ISP3	น้อย	Moderate Pink
	ISP4	ปานกลาง	Moderate Pink
	ISP5	น้อย	Moderate Pink
	ISP7	น้อย	Light Pink
	ISP9	น้อย	White
	NA	ดี	Pale Pink
	Glu	น้อย	Light Pink
	Su	น้อย	White

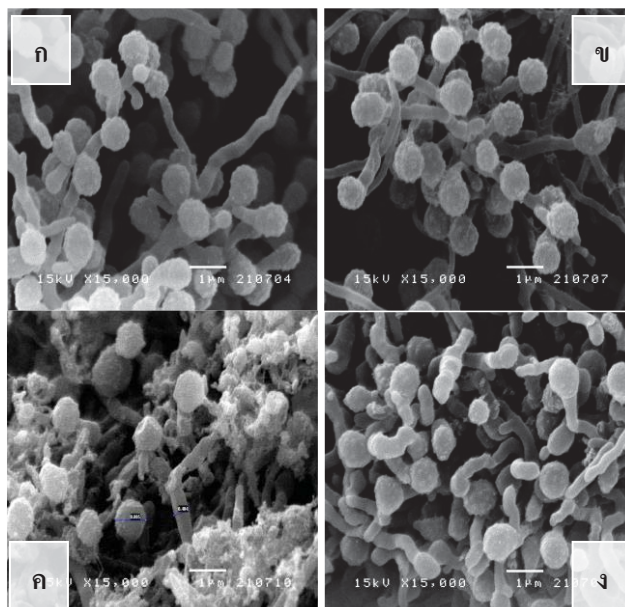
หมายเหตุ ISP2, Yeast extract-Malt extract agar; ISP3, Oatmeal agar; ISP4, Inorganic salt-starch agar; ISP5, Glycerol-asparagine agar; ISP7, Tyrosine agar; ISP9, Carbon utilization medium; NA, Nutrient agar; Glu, Glucose asparagine agar; Su, Czpek's sucrose agar



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของโคโลนีของแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน

- ก) สายพันธุ์ PKB32-7-12; ข) สายพันธุ์ PKB32-7-22; ค) สายพันธุ์ PKB32-13-13;
ง) สายพันธุ์ PKB32-19

ศึกษาลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 และ สายพันธุ์ PKB32-19 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 15,000 เท่า พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวบนก้านชูสปอร์สายสั้นๆแสดงว่าอยู่ในกลุ่ม *Micromonospora* ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Bt ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 15,000 เท่า ก) สายพันธุ์ PKB32-7-12; ข) สายพันธุ์ PKB32-7-22; ค) สายพันธุ์ PKB32-13-13 และ ง) สายพันธุ์ PKB3231-19

4.2.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซีที่คัดเลือกได้จำนวน 14 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าส่วนมากสามารถเจริญบนอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 2 % ที่สภาพความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 8 ช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 15 พบว่าแอคติโนมัยซี 10 สายพันธุ์ได้แก่ PKB12-7, PKB31-19, PKB32-1, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-9-1, PKB32-13-12, PKB32-13-13 และ PKB32-18 สามารถย่อยโปรตีนในนม แอคติโนมัยซี 9 สายพันธุ์ได้แก่ PKB12-7, PKB31-10, PKB31-19, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-13-12, PKB32-18 และ PKB32-24 สามารถย่อยแป้งได้ ทุกสายพันธุ์สามารถย่อยเจลาตินได้และรีดิวส์ไนเตรตได้ยกเว้นสายพันธุ์ PKB12-7, PKB32-1 และ PKB32-24

จากตารางที่ 16 พบว่าแอคติโนมัยซี 8 สายพันธุ์สามารถใช้ sucrose และ mannose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี และสามารถใช้น้ำตาล manitol และ D-ribose เป็นแหล่งคาร์บอนได้น้อย

ตารางที่ 14 แสดงผลทดสอบทางสรีรวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

Strain no.	NaCl tolerance (%)							pH tolerance					Growth at (°C)					
	0	1	2	3	4	5	6	4	5	6	7	8	10	28	30	37	45	50
PKB12-7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB31-10	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB31-19	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PKB32-7-12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-7-21	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-7-22	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
PKB32-9-1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
PKB32-13-12	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-13-13	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-18	+	+	+	-	-	-	-	-	w	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-19	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
PKB32-24	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

หมายเหตุ + = positive reaction

- = negative reaction

w = weakly reaction

ตารางที่ 15 ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก

Strain NO.	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
	peptonize	coagulation			
PKB12-7	+	+	+	-	+
PKB31-10	-	-	+	+	+
PKB31-19	+	+	+	+	+
PKB32-1	+	+	+	-	-
PKB32-7-12	+	+	+	+	+
PKB32-7-21	+	+	+	+	+
PKB32-7-22	+	+	+	+	+
PKB32-8	+	-	+	+	-
PKB32-9-1	+	+	+	+	-
PKB32-13-12	+	+	+	+	+
PKB32-13-13	+	+	+	+	-
PKB32-18	+	+	+	+	+
PKB32-19	-	-	+	+	-
PKB32-24	-	-	+	-	+

หมายเหตุ + = positive reaction

- = negative reaction

4.3 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

เนื่องจากแอคติโนไมซีตสายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 และ PKB32-24 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และสายพันธุ์ PKB32-24 และ PKB32-7-22 สามารถยับยั้ง *Ralstonia solanacearum* ได้ดี จึงได้ทำการวิเคราะห์ผนังเซลล์ของแอคติโนไมซีตสองสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่ามีผนังเซลล์แบบ *meso* ไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นลักษณะของผนังเซลล์ในสกุล *Micromonospora* และ *Microbispora* (Holt, 1989)

การวิเคราะห์เมนาควิโนนของแอคติโนไมซีต 4 สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ PKB32-7-12 และ PKB32-7-22 มีเมนาควิโนนหลักแบบ MK9H₄ และ MK9H₈ แต่สายพันธุ์ PKB32-13-13 มีเมนาควิโนนหลักแบบ MK9H₄, MK9H₈ และ MK10H₄ ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Micromonospora* และสายพันธุ์ PKB32-24 มีเมนาควิโนนหลักแบบ MK9H₀ และ MK9H₂ ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Microbispora* (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ชนิดของ menaquinone

Strain no.	ชนิดของผนังเซลล์	Menaquinone					
		MK9H ₀	MK9H ₂	MK9H ₄	MK9H ₆	MK9H ₈	MK10H ₄
PKB32-7-12	<i>meso</i> -DAP	-	6.69%	27.10%	5.24%	32.87%	6.639%
PKB32-7-22	<i>meso</i> -DAP	-	5.31%	27.43%	11.37%	28.35%	7.96%
PKB32-13-13	<i>meso</i> -DAP	-	-	19.07%	14.42%	30.99%	19.95%
PKB32-24	<i>meso</i> -DAP	45.95%	29.14%	3.23%	-	-	-

เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสายพันธุ์ PKB32-7-22 แล้วจึงนำมาวิเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ ผลการวิเคราะห์กรดไขมันหลักของสายพันธุ์ PKB32-7-22 พบว่าเป็น iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} และ anteiso-C_{17:0} (ตารางที่ 18) ซึ่งเป็นชนิดที่พบในสกุล *Micromonospora*

ตารางที่ 18 กรดไขมันของสายพันธุ์ PKB32-7-22 และ *M. chersina*

Fatty acid	PKB32-7-22	<i>M. chersina</i>
Saturated fatty acids		
C _{12:0}	0.47	ND
C _{14:0}	0.24	ND
C _{16:0}	1.53	2
C _{17:0}	3.81	5
C _{18:0}	1.62	ND
C _{19:0}	0.39	ND
Unsaturated fatty acids		
C _{17:1} ω 8c	3.93	4
C _{17:1} ω 5c	0.15	ND
C _{18:1} ω 9c	1.54	ND
C _{18:1} ω 9c	ND	2
Branched fatty acids		
iso-C _{13:0}	0.22	ND
iso-C _{14:0}	1.00	ND
anteiso- C _{14:0}	0.11	ND
iso-C _{15:0}	21.23	21
anteiso- C _{15:0}	4.11	5
isoG-C _{15:1}	0.53	ND
iso-C _{16:0}	23.05	15
isoH-C _{15:1}	2.21	ND
iso-C _{17:0}	8.27	10
anteiso- C _{17:0}	10.34	16
anteiso- C _{17:0} ω 9c	1.51	ND
iso-C _{18:0}	1.25	1
iso-C _{19:0}	0.11	ND
10-Methylated fatty acids		
10-Methylated C _{16:0}	ND	ND

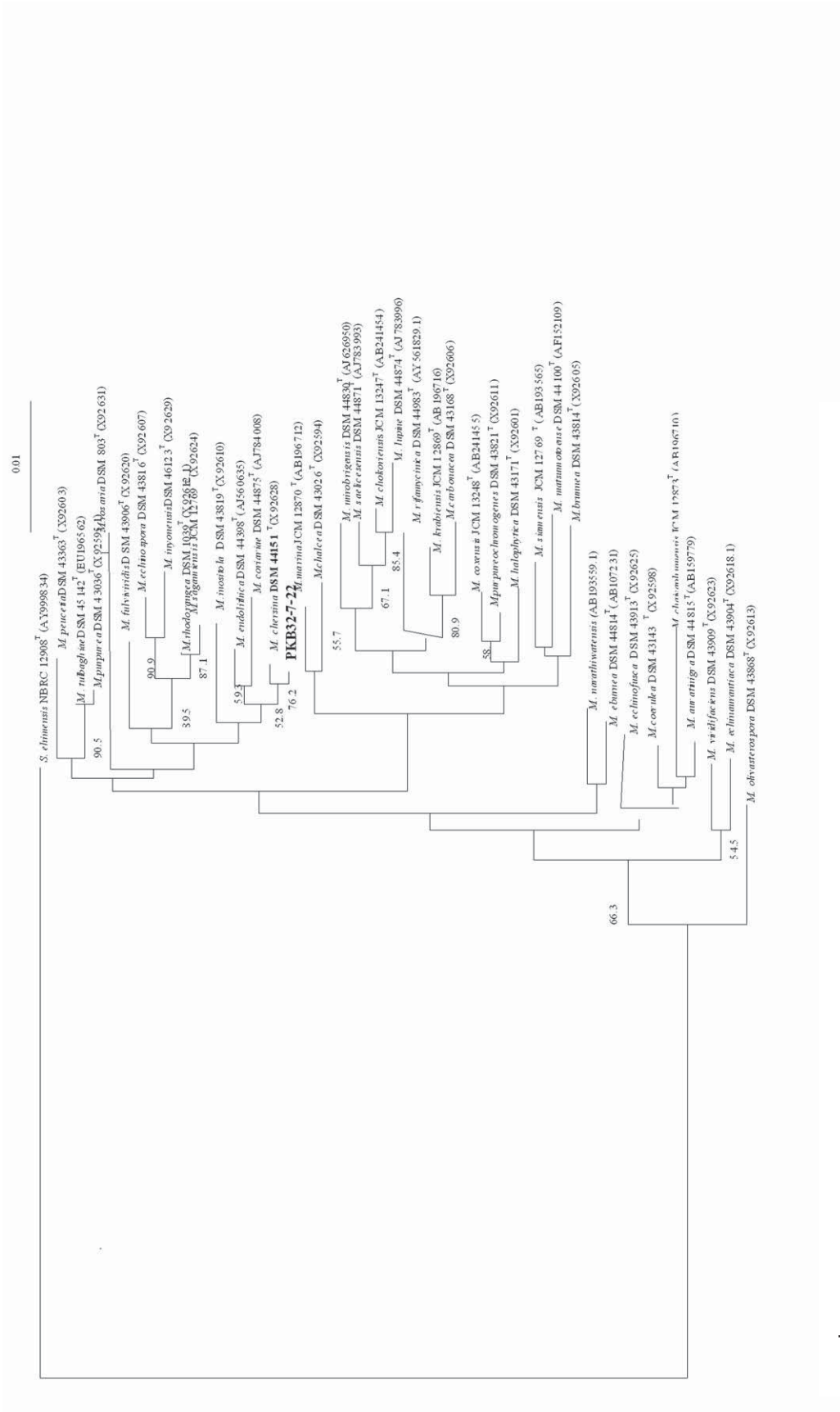
Fatty acid	PKB32-7-22	<i>M.chersina</i>
10-Methylated C _{17:0}	4.24	2
10-Methylated C _{18:0}	0.72	4
Summed Feature 3	0.29	4
Summed Feature 6	0.78	ND
Summed Feature 8	0.21	ND
Summed Feature 9	6.04	ND

หมายเหตุ Summed Feature 3, 16:1 w7c/16:1 w6c; Summed Feature 6, 19:1 w11c/19:1 w9c;
Summed Feature 8, 18:1 w7c และ Summed Feature 9, 16:0 10-methyl ส่วน ND, not data

4.4 การวิเคราะห์ลำดับบน 16S rDNA และการสร้าง **phylogenetic tree**

4.4.1 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยวิธี PCR และการสร้าง phylogenetic tree

เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์การต้านแบคทีเรียดีและอาจจะเป็นแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ จึงได้นำสายพันธุ์ PKB32-7-22 และ PKB32-24 มาศึกษาการเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยวิธี PCR และทำการสร้าง phylogenetic tree จากการศึกษาการเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยวิธี PCR ทำให้ได้ลำดับเบสใน 16S rDNA ของสายพันธุ์ PKB32-7-22 และ PKB32-24 จากนั้นจึงนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสายพันธุ์ PKB32-7-22 จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* ซึ่งเป็นสปีชีส์ใหม่ที่มีความคล้ายคลึง 99 % ของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เมื่อเทียบกับ *M. chersinia* DSM 44151^T, *M. inositola* DSM 43819^T และ *M. endolithica* DSM 44398^T (ภาพที่ 9) สำหรับสายพันธุ์ PKB32-24 จัดอยู่ในสกุล *Microbispora* และเป็นสปีชีส์ใหม่ที่มีความคล้ายคลึง 98 % ของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA เมื่อเทียบกับ *M. corallina* DSM 44682^T และ *M. rosea* subsp. *rosea* DSM 43839^T (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่ง PKB32-7-22 บน Phylogenetic tree

จากข้อมูลการเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี และการใช้แหล่งคาร์บอนสรุปของสายพันธุ์ PKB32-7-22 เทียบกับ *M. chersina* ATCC 53710^T, *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. inositola* DSM 43819^T (ตารางที่ 19) พบว่าสีของเส้นใยอาหารของสายพันธุ์ PKB32-7-22 ต่างกับ *M. chersina* ATCC 53710^T, *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. inositola* DSM 43819^T แต่มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเหมือนกัน ทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *M. chersina* ATCC 53710^T สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 41-49 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ PKB32-7-22 และ *M. chersina* ATCC 53710^T สามารถย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง ส่วน *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. endolithica* DSM 44398^T ไม่มีข้อมูล สายพันธุ์ PKB32-7-22 และ *M. chersina* ATCC 53710^T รีดิวส์ไนเตรตได้ ส่วน *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. endolithica* DSM 44398^T ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตได้ ทั้งสามสายพันธุ์สามารถใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผนังเซลล์ของทั้งสามสายพันธุ์เป็นแบบ meso-DAP ส่วนเมนาควิโนนหลักของ PKB32-7-22 เป็น MK-9H₄ และ MK-9H₈ แต่ *M. chersina* ATCC 53710^T, *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. endolithica* DSM 4439 มีเมนาควิโนนหลักแบบ MK10-H₄ จากข้อมูลจากตารางพบว่ามีความแตกต่างของ PKB32-7-22 ระหว่าง *M. chersina* ATCC 53710^T, *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. inositola* DSM 43819^T อย่างชัดเจนจึงสามารถสรุปได้ว่า สายพันธุ์ PKB32-7-22 เป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora*

ตารางที่ 19 ลักษณะของ PKB32-7-22 เทียบกับ *M. chersina* DSM 44151^T, *M. endolithica* DSM 44398^T และ *M. inositola* DSM 43819^T

ลักษณะ	PKB32-7-22	<i>M. chersina</i> DSM 44151 ^T	<i>M. endolithica</i> DSM44398 ^T	<i>M. inositola</i> DSM 43819 ^T
สีของเส้นใยอาหาร	Brownish Black	Colorless to pale yellow	Orange	Orange
ลักษณะของสปอร์	สปอร์เดี่ยว	สปอร์เดี่ยว	สปอร์เดี่ยว	สปอร์เดี่ยว
เจริญที่อุณหภูมิ 28-37 °C	+	+	+	+
41-49°C	-	+	-	-
การเจริญที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0-2%	+	+	+	+
3%	-	+	+	-
7%	+	-	ND	ND
การย่อยเจลาติน	+	+	ND	ND
การย่อยแป้ง	+	+	ND	ND
การใช้โปรตีนในนม	+	-	-	-
การรีดิวส์ไนเตรด	+	+		
การใช้แหล่งคาร์บอน	+		ND	ND
Manitol	+	-	ND	ND
Glycerol	+	+	ND	ND
D-Arabinose	+	+	ND	ND
D-Xylose	+	+	ND	ND
Lactose	+	+	ND	ND
Melibiose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	ND	ND
Salicin	meso-DAP	+	meso-DAP	meso-DAP
ผนังเซลล์	MK-9H ₄ และ MK-9H ₈	meso-DAP	MK-10H ₄	MK-10H ₄
ชนิดของ menaquinone		MK10-H ₄		

สายพันธุ์ PKB32-7-22 สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร ผิวของสปอร์มีลักษณะขรุขระ สปอร์ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ โคโลนีมีสี Brownish Black บนอาหาร yeast extract- malt extract (ISP 2) แล้วเปลี่ยนเป็นเมือกสีดำ สามารถย่อยโปรตีนในนม ย่อยเจลาติน ย่อย

แป้ง และรีดิคัลไนเตรตได้ เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่ 2% เจริญในช่วงความเป็นกรดค่าที่ 5-8 สามารถใช้น้ำตาล manitol, D-ribose, L-rhamnose, D-melibiose, glycerol, salicin, lactose, cellobiose, sucrose และ *myo*-inositol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ส่วนน้ำตาล D-raffinose, L-arabinose, D-fructose และ mannose เป็นแหล่งคาร์บอนได้น้อย ไม่สามารถใช้ น้ำตาล D-xylose และ galactose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผนังเซลล์มี diaminopimelic acid ชนิด *meso* ไอโซเมอร์ มีเมนาควิโนนชนิด MK-9H₄ และ MK-9H₈ เป็นองค์ประกอบหลัก กรดไขมันประกอบด้วย C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{19:0}, C_{17:1}, ω8c, C_{17:1}, ω5c, C_{18:1}, ω9c, C_{18:1}, ω9c, iso-C_{13:0}, iso-C_{14:0}, anteiso- C_{14:0}, iso-C_{15:0}, anteiso- C_{15:0}, isoG-C_{15:1}, iso-C_{16:0}, isoH-C_{15:1}, iso-C_{17:0}, anteiso- C_{17:0}, anteiso- C_{17:0}, ω9c, iso-C_{18:0}, iso-C_{19:0}, 10-Methylated C_{16:0}, 10-Methylated C_{17:0} และ 10-Methylated C_{18:0} (ตารางที่ 18)

จากข้อมูลการเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีและการใช้แหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์ของ PKB32-24 เทียบกับ *Mb. rosea subsp. rosea* DSM 43839^T และ *Mb. corallina* DSM 44682^T (ตารางที่ 20) พบว่าทุกสายพันธุ์มีผนังเซลล์แบบ meso-DAP และมีเมนาควิโนนแบบ MK-9H₀, MK-9H₂ และ MK-9H₄ และสามารถรีดิวส์ไนเตรตได้ส่วนการเจริญที่อุณหภูมิ 28-27 °C การย่อยโปรตีนในนม และการย่อยเจลาติน นั้นไม่มีข้อมูล จากความแตกต่างนี้คาดว่าสายพันธุ์ PKB32-24 สปีชีส์ใหม่ของสกุล *Microbispora*

ตารางที่ 21 ลักษณะของ PKB32-24 เทียบกับ *Mb. rosea subsp. rosea* DSM 43839^T และ *Mb. corallina* DSM 44682^T

ลักษณะ	PKB32-24	<i>Mb. rosea subsp. rosea</i> DSM 43839 ^T	<i>Mb. corallina</i> DSM 44682 ^T
เจริญที่อุณหภูมิ 28-37 °C	+	ND	ND
การย่อยโปรตีนในนม	-	ND	ND
การย่อยเจลาติน	+	ND	ND
การรีดิวส์ไนเตรต	-	+	+
การใช้แหล่งคาร์บอน			
D-melibiose, Salicin และ	+	+	ND
galactose	+	-	ND
D-Ribose	+	-	ND
L-Rhamnose	+	-	ND
L-Arabinose	+	-	+
Inositol	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP
ผนังเซลล์	MK-9H ₀ , MK-	MK-9H ₀ , MK-9H ₂ และ	MK-9H ₀ , MK-9H ₂ และ
ชนิดของ menaquinone	9H ₂ และ MK-9H ₄	MK-9H ₄	MK-9(III, VIII, H ₄)

สายพันธุ์ PKB32-24 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โคโลนีมีสี Deep Reddish Orange บนอาหาร yeast extract malt extract (ISP2) สปอร์มีสี Moderate pink เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่ 2% สามารถย่อยเจลาติน และ แป้ง ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรต และโปรตีนในนมได้ สามารถเจริญในช่วงความเป็นกรดค่าที่ 5-8 เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส สามารถใช้น้ำตาล D-melibiose, salicin, galactose, D-ribose, L-rhamnose, L-arabinose, myo-inositol และ mannose เป็นแหล่ง

คาร์บอนได้ดี ไม่สามารถใช้ manitol, D-raffinose, cellobiose และ D-fructose มี diaminopimelic acid ชนิด *meso* ไอโซเมอร์เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ มีเมนาควิโนนชนิด MK-9H₀ และ MK-9H₂ เป็นองค์ประกอบหลัก

4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

เนื่องจากสายพันธุ์ PKB31-19, PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-19 และ PKB32-24 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด จึงนำสายพันธุ์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกน้ำเลี้ยงเซลล์ (broth) ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ครั้งละ 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไดคลอโรมีเทนที่สกัดได้ไประเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.1, 0.1, 0.3, 2.13 และ 0.03 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 21) โดยพบว่าสารสกัดหยาบทุกชนิดมีสีดำ ยกเว้นสารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ PKB32-24 ที่เป็นผลึกสีน้ำตาล (ตารางที่ 21) นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (*B. subtilis* ATCC 6633) ด้วยวิธี disc diffusion method โดยเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร เนื่องจากสารสกัดหยาบชนิดนี้มีปริมาณต่ำ จึงไม่เพียงพอสำหรับการเตรียมในดิสก์ที่มีขนาดใหญ่ จากนั้นนำดิสก์ที่เตรียมได้มาวางบนอาหาร muller hinton agar ที่มีการทาแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่าสารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22 และ PKB32-19 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าว ในขณะที่สารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ PKB31-19 และ PKB32-24 สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 20 มิลลิกรัม/ดิสก์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 21 ปริมาณและลักษณะของสารสกัดหยาบของแอคติโนไมซีตหายากสายพันธุ์ต่างๆ

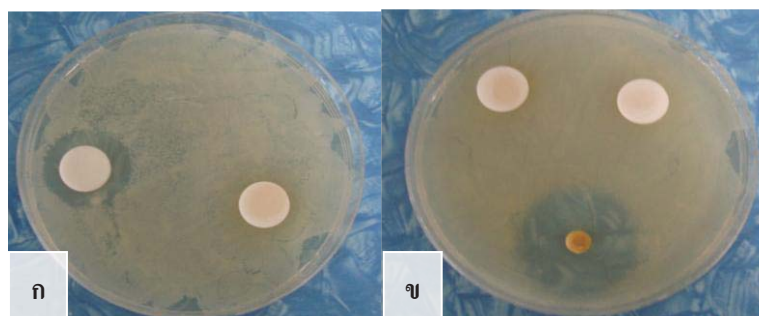
Strain no.	ปริมาณสารสกัดหยาบ(กรัม)	ลักษณะของสารสกัดหยาบ
PKB31-19	0.1	ของแข็งสีดำ
PKB32-7-12	0.1	ของแข็งสีดำ
PKB32-7-22	0.3	ของแข็งสีดำและผลึกไม่มีสี
PKB32-19	2.13	ของแข็งสีดำ
PKB32-24	0.03	ผลึกสีน้ำตาล

ตารางที่ 22 การยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบของแอคติโนไมซีตหายากสายพันธุ์ต่างๆ

Strain no.	ปริมาณของสารสกัดหยาบ(ไมโครกรัม)			
	10	20	30	40
PKB31-19	-	-	-	+
PKB32-7-12	-	-	-	-
PKB32-7-22	-	-	-	-
PKB32-19	-	-	-	-
PKB32-24	-	+	ND	ND

หมายเหตุ -, ไม่มีการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633; +มีการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633;

ND, No data



ภาพที่ 11 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสายพันธุ์ PKB31-19 และ สายพันธุ์ PKB32-24

(ก: PKB31-19, ข: PKB32-24)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ทำการคัดแยกแอสโคสปอร์จากดินรอบรากและรากหน่อไม้ฝรั่งจากจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ได้ 25 สายพันธุ์ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 10 สายพันธุ์ (40%) ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ 8 สายพันธุ์ (32%) ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 7 สายพันธุ์ (28%) และไม่ยับยั้งยีสต์

2. ทำการคัดเลือกแอสโคสปอร์ 14 สายพันธุ์ ได้แก่ PKB12-7, PKB31-10, PKB31-19, PKB32-1, PKB32-7-12, PKB32-7-21, PKB32-7-22, PKB32-8, PKB32-9-1, PKB32-13-12, PKB32-13-13, PKB32-18, PKB32-19 และ PKB32-24 ไปทำการศึกษาคูต่อไป

3. ทำการคัดเลือกแอสโคสปอร์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13, PKB32-19 และ PKB32-24 เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดมาทำการศึกษาลักษณะการเจริญพบว่า 4 สายพันธุ์ PKB32-7-12, PKB32-7-22, PKB32-13-13 และ PKB32-19 จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* ส่วน PKB32-24 จัดอยู่ในสกุล *Microbispora*

4. ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญสรีรวิทยา จีวเคมี ลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์เฉพาะของ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PKB32-7-22 และ สายพันธุ์ PKB32-24 เนื่องจากมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียดีและอาจจะเป็นแอสโคสปอร์สายพันธุ์ใหม่ ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ PKB32-7-22 เป็น *Micromonospora* เนื่องจาก มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนไพเมลิกในผนังเซลล์เป็นแบบ meso-DAP สายพันธุ์นี้มีกรดไขมันชนิด iso-C_{15:0} (21.2%), iso-C_{16:0} (23.1%) และ anteiso-C_{17:0} (10.3%) และเมนาควิโนนชนิด MK-9H₄ และ MK-9H₂ เป็นองค์ประกอบหลัก และจากการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลจาก 16S rRNA และนำลำดับเบส 16S rRNA ของสายพันธุ์ PKB32-7-22 มาเทียบกับลำดับเบสที่รวบรวมในฐานข้อมูล GeneBank DNA database พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของสายพันธุ์ PKB32-7-22 เป็น *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่ที่มีความคล้ายคลึง 99% ของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA กับ *M. chersinia* DSM 44151^T, *M. inositola* DSM 43819^T และ *M. endolithica* DSM 44398^T

5. สายพันธุ์ PKB32-24 เป็น *Microbispora* เนื่องจากมีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนไพเมลิกในผนังเซลล์เป็นแบบ meso-DAP ส่วนชนิดของเมนาควิโนนคือ MK9H₀ และ MK9H₂ เป็นองค์ประกอบหลัก และจากการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลจาก 16S rRNA และนำลำดับเบส 16S rRNA ของสายพันธุ์ PKB32-24 มาเทียบกับลำดับเบสที่รวบรวมในฐานข้อมูล

GeneBank DNA database พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของสายพันธุ์ PKB32-24 เป็น *Microbispora* สปีชีส์ใหม่ที่มีความคล้ายคลึง 98% ของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA กับ *Mb. corallina* DSM 44682^T และ *Mb. rosea subsp. rosea* DSM 43839^T

6. จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีตด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบไคคลอโรมีเทนจากเชื้อ PKB31-19 และ PKB32-24 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ ได้ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 20 มิลลิกรัม/ดิสก์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดสกัดหยาบจากไคคลอโรมีเทนของสายพันธุ์ PKB32-7-12 , PKB32-7-22 และ PKB32-19 ไม่ยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบ

บรรณานุกรม

- ปิยธิดา พุกคล้าย . 2549. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์จากพืชสมุนไพรเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคค่น้ำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 113หน้า.
- Arai, T. 1975. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The society for actinomycetes
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil Microbiology. 2nd ed. Wiley&Sons, New York. 427p.
- Ames, R.N., Reid, C.P and Ingham, E.R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 96, 555–563.
- Becker, B., M.P. Lechevalier and H.A. Lechevalier. 1965. Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 13: 236-238.
- Basilio, A., I. González, M.F. Vicente, J. Gorrochategui, A. Cabello, A. González and O. Genilloud. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.* 95: 814-823.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* (Tokyo) 58:1–26.
- Boone, C.J and Pine, L. 1968. Rapid method for characterization of actinomycetes by cell wall composition. *Appl. Microbiol.*, 16: 279-284.
- Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.* 161: 288-298.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghious, S., Zerizer, H. Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A. and Boiron, P. 2005. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale / J. Med Mycol.* 15:39-44.
- Bowen, T., Stackebrandt, E., Dorsch, M., and Embley, T. M. 1989. The phylogeny of *Amycolata autotrophica*, *Kibdelosporangium aridum* and *Saccharothrix australiensis*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2529-2536
- Carlsohn, M.R., Groth, I., Tan, G.Y., Schütze, B., 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.

- Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y. and Zhou, S. 2004. Isolation of endophytic actinomycetes from root and leave of banana (*Musaacuminata*) plant and their actives against *Fusarium oxysporum* F. sp. Cubense. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 501-504.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. 2004. Isolation and characterization of Endophytic *Streptomyces* from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) root. *Letters. Appl. Microbiol.* 39 : 425-430.
- Colquhoun, J.A., J. Mexson, M. Goodfellow, A.C. Ward, K. Horikoshi and A.T. Bull. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *A. van. Leeuw.* 74: 27-40.
- Coombs, J. T. and Franco, C. M. M. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 5603-5608.
- 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.
- Couch, J. N. 1963. Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. *J. Elisha. Mitchell. Sci. Soc.* 79 : 53-70.
- Couch, J. N., and C. E. Bland. 1974. The Actinoplanaceae. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (Eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 706–723.
- Cummins, C.S. and H. Harris. 1956. The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* 14: 583-600.
- David, G. H. G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. *J. Gen. Microbiol.* 21:612-621.
- Eccleston, G.P., Brooks, P.R., Kurtböke, D.I. 2008. The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia. *Mar. Drugs*, 6: 243-261.
- Elliot, L.F. and Lynch, J.M., 1995. The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *Am. J. Alt. Agric.* 10, 50–73.

- Ettinger, L., Corbaz, R. and Hutter, R. 1958. Zur Systematik der Actinomyceten.4. Eine Arteinteilung der Gattung Streptomyces waseman et Henrici. *Arch. Mikrobiol.* 31:326-358.
- Embley, T. M., J. Smida, and E. Stackebrandt. 1988. Reverse transcriptase sequencing of 16 ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.* 134:961-966.
- Embley, T. M., J. Smida, and E. Stackebrandt. 1988. The phylogeny of mycolateless wall chemotype IV actinomycetes and description of *Pseudonocardiaceae* fam. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 44-52
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. and Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 54: 401-415.
- Goodfellow, M. 1985. The actinomycetes, pp. 211-231. In N. A. Logan, ed. *Bacterial Systematic*. Blackwell Scientific Publication, London.
- Goodfellow, M. 1989a. "Suprageneric classification of actinomycetes" in Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 2333-2339
- Goodfellow, M. 1989b. Maduromycetes. In: S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore,MD. 4:2509-2510.
- Goodfellow, M. 1989c. Suprageneric classification of actinomycetes. In: S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 4:2333-2339.
- Goodfellow, M., Stanton, L. J., Simpson, K. E. and D. E. Minnikin. 1990. Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *J Gen. Microbiol.* 136:19-34.
- Halder, A.K., Mishra, A.K., Chakrabarty, P.K., 1991. Solubilization of inorganic phosphates by Bradyrhizobium. *Ind. J. Exp. Biol.* 29, 28-31.
- Henssen, A. 1957. Beitrge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Arch. Microbiol.* 26:373-414.
- Hayakawa, M., K. Ishizawa, and Momura, H. 1988. Distribution of rare actinomycetes in japan soils. *J. Ferment. Technol.* 66:367-373.

- Hirsch, P., Mevs, U. Kroppenstedt, R.M., Schumann, P and Stackebrandt, E. 2004. Cryptoeンドolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* jensen 1932. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 166-174.
- Holmalahti, J., Von Wright and Raatikainen, A. O. 1994. Variation in the spectra of biological activities of actinomycetes isolation from different soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 18:1544-1546
- Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. In S. T. William , M.E. Sharpe, and J. G. Holt (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 4, pp. 2333-2450. Baltimore: Williams and Wilkins
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA. pp. 787.
- Huang, Y., W. Qi, Z. Lu, Z. Liu and Goodfellow (2001) *Amycolatopsis rubida* sp. nov., a new *Amycolatopsis* species form soil. *Int. J. Evol. Microbiol.* 51:333-351.
- Iwai, Y and Takahashi, Y. (1992). Selection of microbial sources of bioactive compounds. In S. Omura (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*. Springer-Verlag New York. p. 281–302
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719-1728.
- Janet, M. de Araujo, Adilson C. da Silva and Joao L. Azevedo. (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea May L.*) *Braz. Arch. Boil. Technol.* 43.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J and Fenical, W. 2005a. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* 7: 1039-1048.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 87: 43-48
- Jiang, C. and Xu, L. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 249-253.
- Jongrunguangchock, S. Tanasupawat, S. and Kudo T. 2008. *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:924-928.

- Jongrunguangchock, S. Tanasupawat, S. and Kudo T. 2008b. *Micromonospora krabienesis* sp. nov., isolated from marine soils in Thailand. *J. Gen Appl. Microbiol.* 54:127-133
- Kalakoutskii, L. V. and Agre, N. S. 1976. Comparative aspect of development and differentiation on actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* 40:469-524.
- Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*, In: William, S.T., Sharpe, M. E. and Holt, J.G. (eds) *Bergey's manual of determinative bacteria*. Vol. 4(pp.2544-2540) The William & Wilkins, Baltimore.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A. and Boiron, P. 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale / J. Med Mycol.* 15:45-51
- Komagato, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 19: 161-207.
- Kron-Wendisch, F. Kempf, A., Grund, E., Kroppenstedt, R. M. Kron-Wendisch, F. Transfer of *Faenia rectevirgula* Kurp and Agre 1983 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *Saccharopolyspora hirsute* *supsp. tebri* Labeeda 1987 to species level, and Emended description of the genus *Saccharopolyspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:67-77.
- Kron-Wendisch, F. Kron-Wendisch, F. 1992. The family *Streptomycetaceae*, In: Balow, A., Truper, H.G., Dworkin, M. Harder, M. and Schleifer, K. H.(eds.) *The Prokaryotes*,(pp.921-995) Springer-Verlag, New York. Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. and Goodfellow M. 1990. Taxonomic revision of the actinomycete Genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.* 13:148-160
- Kroppenstedt, R. M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: M. Goodfellow and D. E. Minnikin (Eds.) *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press. London, UK. 173–199.
- Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. and Goodfellow. M. 1990. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.* 13:148–160.
- Kudo, T., Itoh, T., Miyadoh, S., Shomura, T. and Seino, A. 1993. *Herbidospora* gen. nov., a new genus of the family *Streptosporangiaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:319–328.
- Kudo, T. 2008. Diversity and systematic of actinomycetes. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการ

ประยุกต์ใช้แบบที่เรียและราเอนโดไฟท์ ครั้งที่ 1: การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์. ศูนย์
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและราเอนโดไฟท์ (BNPME).
20-21 ตุลาคม 2008. กรุงเทพฯ.

- Labeda, D.P. 1986. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *J. Indust. Microbiol. Suppl.*, 2: 115-121.
- Lawin, B. (2000) Gene VII. Oxford University Press, Inc., New York. 990p .
- Lechevalier, M. P., and H. A. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20:435–443.
- Lechevalier, M. P., DeBeievery, C. and Lechevalier, H. A. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 435-443.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. 1980. “Procedures for studying and characterizing actinomycetes with emphasis on streptomycetes. Part III. A university laboratory approach) emphasis on generic characterization)” in *Actinomycete Taxonomy* (Dietz A and Thayer DW, eds.). SIM Special Publication Number 6, Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA.pp. 225-291.
- Lechevalier, M.P., Stern, A.E. and Lechevalier, H.A. 1981. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. *Zentbl Bakteriol Hyg Abt1 Suppl* 11: 111-116.
- Iinuma, S., A. Yokota, T. Hasegawas, and T. Kanamura. 1994. Actinocorallia gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:235–245.
- Lo, C.W., Lai, N.S., Cheah, H.Y., Wong, N.K. I. and Ho, C.C. 2002. Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker Range Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*. July-Sept, 2002.
- Locci, R. and Balden, B. P. 1971. On the spore formation process in actinomycetes. I Morphology and Development of *Streptoverticillium* species as examined by scanning electron microscopy. *Riv. Pat. Veg. Ser. IV. Suppl.* 7:3-19
- Locci, R. and Schofield, G. M. 1989. Genus *Streptoverticillium* In:Williams, S. T., Sharpe M.E. and J. G.:Holt (eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, (pp.2492-2504) TheWilliams & Wilkins, Baltimore
- McCarthy, A., and Cross, T. 1984. A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. *J.Gen. Microbiol.* 130:5–25.
- McCarthy, A. J. 1989. Genus *Saccharomonospora*, In: Williams S.T., Sharpe M.E. and J. G.:

- Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, (pp.2402-2404) TheWilliams & Wilkins, Baltimore.
- McCarthy, A. J. and William, S.T. 1992. Actinomycetes as agent of biodegradation in the environment-a review. *Gene*. 115:189-192.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes Japan*. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan
- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K. I. and Kudo, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int. J.Syst. Bacteriol.* 49:1761–1767.
- Nonomura, H., and Ohara, Y. 1957. Distribution of actinomycetes in the soil. II: *Microbispora*, a new genus of the *Streptomycetaceae*. *J Ferment. Technol.* 35:307–311.
- Nonomura, H. 1989a. Genus *Microbispora* Nonomura and Ohara 1957, 307. In: S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 4:2526–2531.
- Nonomura, H., 1989b. Genus *Streptosporangium*. Couch. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2545–2551.
- Prabahar, 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.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E., Ward, A.C. Horikoshi, K., Bull, A. T. and Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10: 181-189.
- Pernodet, L. L., M. T. Bocard, Alegre, J. Gagnet and M. Guerineau (1989) Organization and nucleotide sequence analysis of ribosomal RNA gene cluster Form *S. ambofaciens*. *Gene*.79:33-46.
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Saradi, P., Saracchi, M. and Andriollo1992. A sporangiate actinomycete with Unusual morphological features. *Streptosporangium claviforme* sp. Nov. *Actinomycetes* 3: 45-50.
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Saracchi, M. and Saradi, P.1993. A new genus of madoromycetes: *Planopolyspora* gen. Nov. *Actinomycetes* 4: 8-18.
- Pridham, T. G., Hasseltine, C. W. and Benedict, R. G. 1958. A guide for the classification of

- Streptomycetes according to selected group. Placement of strain in morphological section. *Appl. Microbiol.* 6:51-79
- Ranmoa, H., Guizhen, W. and Junying, I. 1993. A new genus of actinomycetes, *Planotetraspora* Gen. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 469-470
- Rifaat, H.M. 2003. The biodiversity of actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. *J. Mediterranean. Ecol.*, 4: 5-7.
- Rheims, H., Schumnn, P., Rohde, M., and Stackebrandt, E. 1998. *Verrucosispora giffhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *Int. Syst. Bacteriol.* 48: 1119-1127
- Rao, V. A., Prabhu, K. K., Sridhar, B. P., Venkateswarlu, A. and Actor, P. 1987. Two new species of *Microbispora* from Indian soils: *Microbispora karnatakensis* sp. nov. and *Microbispora indica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:181-185.
- Saadoun, I., K.M. Hameed and A. Moussauui. 1999. Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios* 99: 173-179.
- Sardi, P., M. Saraeehi, S. Quaroni, B. Peterolini, G. E. Boronovi and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* สายพันธุ์ from surface-steriled roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8):2691-2693.
- Sanglier, J. J.M Wellington, E.M.H., Behal, V., Fiedler, H.P., Ellouz Ghorbel, R., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D.K., Prinzis, S., and Trigo, C. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research Microbiol.* 144: 661-663
- Shin, H. J., Mojid Mondol, M.A., Kyung Yu, T., Lee, H. S., Lee, Y. J. Jung, H. J., Kim, J. H. and Kwon, H. J. 2010. An angiogenesis inhibitor isolated from a marine-derived actinomycete, *Nocardiosis* sp. 03N67. *Phytochemistry Letters*. 3:194-197
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb (1966) Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. of Syst. Bacteriol* 16:313-340.
- Shepherd, F.W. 1969. Asparagus Minnitary of Agriculture Fisheries and Food. Bulletin 60. Her Majesty's Stationary Office. London. p 20.
- Shoemaker, J.S. 1947. Vegetable Growing . John Willey and Sun, Inc. New York. p 506.
- Songsumanus, A. Tanasupawat, S Thawai, C. Suwanboririx, K. and Kudo T. 2011. *Micromonospora humi* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand, , *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1176-1181
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for new hierarchic

- classification system, Actinobacteria classic nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47(2):479-491.
- Sykes, G. and Skinner, F.A. 1973. *Actinomycetales*: Characteristics and practical importance. Academic Press, London.
- Takamustsu, S., Nakano, M., Kunasakdakul, K., Yotaka, H., Kunoh, H. 1999. Cloning and sequence Analysis of the plasmid DNA Found in *Rhizoctonia solani* AG2-2 LP isolate and its potential use for fungal detection. *Mycoscience.* 40:29-34
- Takahashi, Y., Mutsumoto, A. Seino, A. Iwai, Y. And Omura, S. 1996. Rare Actinomycetes Isolated from Desert Soils. *Actinomycetol.* 10:91-97
- Takao, O., T. Kayako, K. Massaki and E. Ryuso. 1995. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. Annual Report Sankyo Research Laboratory. 47:97-106.
- Tamura, T., Hayakawa, M., and Hatano, K. 1997. A new genus of order *Actinomycetales*, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 47: 97-102
- Tanasupawat, S. Jongrungruangchock, S. and Kudo T. 2010. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated sea in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: Inpress.
- Terkina, I. A., Drukker, V. V., Parfenova, V. V and Kostornova, T.Y. 2002. The biodiversity of Actinomycetes in lake baikal. *Microbiol.* 71: 346-349
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. Suwanborirux, K. and Kudo T. 2004 *Micromonospora auratinigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand, *Actinomycetologica.* 18: 8-14.
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. Suwanborirux, K. Suzuki, K. and Kudo T. 2005a. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 417-422.
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. Suwanborirux, K. Suzuki, K. and Kudo T. 2005b. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest, *J. Gen Appl. Microbiol.* 51: 229-234.
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. Suwanborirux, K. Suzuki, K. and Kudo T. 2007. *Micromonospora narathiwaensis* sp. nov. isolated from Thai peat swamp forest, *J. Gen Appl. Microbiol.* 58: 287-293.
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. and Kudo T. 2008. *Micromonospora pattaloonggenesis* sp. nov., isolated from Thai mangrove forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1516-521.

- Thieman, J. E. Pagani, H. and Berretta, G. 1968. A new genus of *Actinomycetales*:
Microtetraspora gen nov. *J. Gen. Microbiol.* 50:295-303.
- Trujillo, M. E. Kroppenstedt, R. M. S, P., C, L. and Martı́nez-Molina1, E. 2006.
Micromonospora coriariae sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*.
Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 56:2381–2385.
- Trujillo, M. E. Kroppenstedt, R. M. S, P., C, L. and Martı́nez-Molina1, E. 2007.
Micromonospora lupini sp. nov. And *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated
 from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 57: 2799–
 2804
- Vobis, G. 1984. Sporogenesis in the *Pilimelia* species, In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F. and
 Yakoleff, V. (eds.) *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspect of actinomycetes*,
 (pp. 423-439) Academic press, Orlando.
- Vobis, G. and Kothe, H. W. 1985. Sporogenesis in sporangiate actinomycetes, In:
 Mukerji, K.G., Pathak, N. C. and Siggh, V. P.(eds.) *Frontiers Applied Microbiology*.
 Vol 1, (pp. 25-470 Print House (india) , Lucknow
- Vobis, G. 1986. Spore development in sporangia-formina actinomycetes, In: Szabo, G., Biro, S.,
 and Goodfellow, M(eds.) *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspect of
 actinomycetes*, (pp. 443-452) Akademiai Kiado, Budapest.
- Vobis, G. 1987. Sporangiate Actinoplaneten Actinomycetales mi taro aquatischen Lebenszyklus.
Forum Mikrobiol. 11:416-424
- Vobis, G. 1989. Actinoplanetes. In: S.T.Williams, M.E.Sharpe and J.G.Holt (eds.) *Bergey's
 Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Vol. 4, pp.
 2418-2450.
- Vobis, G. and Kothe, H.W. 1989. Genus *Ampullariella* Couch 1964, 29^{AL}. In: S.T.Williams,
 M.E.Sharpe and J.G.Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The
 Williams & Wilkins Co., Baltimore, Vol. 4, pp. 2429-2433
- Waskman, S. A. and Woodruff, H. B. 1940. Bacterioatatic and Bactericidal substances produced
 by soil actinomycetes. *J. Bacteriol.* 40:609
- Waskman, S. A. and Henrici. Streptomycetaceae. In: Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974)
Bergey's manual of determinative bacteria. 8th ed . TheWilliam & Wilkins Company,
 Baltimore
- William, S. T. and Sharples, G. P 1976. *Streptosporangium corrugatum* sp. nov. , an actinomycete

- with some unusual morphological features. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26:45-52.
- Yang, S. X., Gao, J. M., Zhang, A. L., and Laatsch, H. 2011. Sannastatin, a novel toxic macrolactam polyketide glycoside produced by actinomycete *Streptomyces sannanensis*. *BIOORG MED CHEM LETT.* 21: 3905-3908
- Zheng, Z., Zeng, W. , Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. and W. Su. 2000. Detection of Antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS. Microbiol. Lett.* 188: 87-91.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Water agar proline

L-Proline	1	g
Tap water	100	ml
Agar	1.5	g
pH 7.0-7.2		

Starch-glycerol agar

Starch	1	g
Glycerol	1	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	g
CaCO ₃	0.2	g
K ₂ HPO ₄	0.1	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	g
NaCl	0.1	g
Water	100	ml
Agar	1.5	g
pH 7.0		

Yeast extract – malt extract agar, YMA, ISP2

Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1	g
Glucose	0.4	g
Agar	1.8	g
Water	100	ml
pH 7.3		

Oatmeal agar, OM, ISP3

Oatmeal	2.0	g
Agar	1.8	g
Water	100	ml

Inorganic salt-starch agar, IS, ISP4

Soluble starch	1.0	g
----------------	-----	---

$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	g
NaCl	0.1	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	g
$CaCO_3$	0.2	g
Trace salt solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g
Water	100	ml
pH 7.0-7.4		
Glycerol-asparagine agar, Gly.A, ISP5		
Glycerol	1.0	g
L-asparagine	0.1	g
K_2HPO_4	0.1	g
Trace salt solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g
Water	100	ml
Tyrosine agar, TA, ISP7		
Glycerol	1.5	g
L-Tyrosine	0.05	g
L-Asparagine	0.1	g
K_2HPO_4	0.05	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	g
NaCl	0.05	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	g
Trace salt solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g
Water	100	ml
pH 7.2-7.4		
Carbon utilization medium, ISP9		
Carbohydrate	1.0	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.264	g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.565	g

KH ₂ PO ₄ •anhydrous	0.238	g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.1	g
Trace salt solution (B)	0.1	ml
Agar	1.5	g
Water	100	ml
pH 6.8-7.0		
Casamino acid 0.05%		
Nutrient agar, NA		
Beef extract	1.0	g
Peptone	1.0	g
NaCl	0.15	g
Agar	1.5	g
Water	100	ml
Glucose asparagine agar		
Glucose	1.0	g
Asparagine	0.05	g
K ₂ HPO ₄	0.05	g
Agar	1.5	g
Water	100	ml
pH 6.8-7.0		
Czpek's sucrose agar		
Sucrose	3.0	g
K ₂ HPO ₄	0.1	g
MgSO ₄	0.05	g
KCl	0.05	g
FeSO	0.001	g
Agar	1.7	g
Water	100	ml
pH7.0-7.2		
Peptone KNO ₃ broth		
Peptone	1.0	g
KNO ₃	0.1	g

NaCl	0.5	g
Water	100	ml
pH 7.0		
Boullion gelatin broth		
Peptone	1.0	g
Meat extract	0.5	g
NaCl	0.5	g
Gelatine	15.0	g
Water	100	ml
pH7.0-7.2		
Peptonization and Coagulation teat medium		
Skim milk	10.0	g
Water	100	ml
Trace salt solution (A)		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
Water	100	ml
Trace salt sution (B)		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	g
Water	100	ml
Mueller-Himton agar		
Beef infusion form	30	g
Casamino acid	1.74	g
Strach	0.15	g
Agar	1.7	g
Water	100	ml

ภาคผนวก ข

สารเคมี

6N HCl

Conc. HCl	60	ml
Distilled water	60	ml
Add conc. HCl into Distilled water		

Ninhydrin solution

Ninhydrin	0.3	g
1-Butanol	100	ml
Glacial acetic acid	3	ml

Nitrate reduction test reagent

Sulphnilic acid solution

Sulphnilic acid	0.8	g
5N Acetic acid	100	ml
Dissolve by gentle heating in fume hood.		

N,N dimethy-1-naphtylamine solution

<i>N,N</i> dimethy-1-naphtylamine	0.5	g
5N Acetic acid	100	ml

Phenol:Choloform (1:1 v/v)

Crystalline phenol was liquidified in water bath 65°C and mixed with chloroform in the ratio of 1:1 (v/v). The solution was stored in a light tight bottle.

10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

The stock solution of 10% SDS was prepared by dissolved 10 g of sodium dodecyl sulphate in 100 ml steried distilled water. Sterilization is not required for the preparation of this stock solution.

20XSSC

3 M NaCl

0.1 M Tris-sodiumcitrate

The 20XSSC was adjusted the pH to 7.0 with 1N NaOH. The Solution was sterilized by autoclaving for 15 minutes at 15 lb/in².

0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9.

Tris	1.21	g
Distilled water	100	ml
Adjust the pH 9 with HCl		

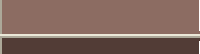
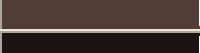
Saline-EDTA

0.1 M NaCl

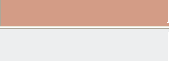
50 mM EDTA (pH 8)

ภาคผนวก ค

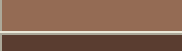
ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System

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	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

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	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System ต่อ

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

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

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

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Yellow, Olive Brown			
82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300	
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40	
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F	
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900	
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F	
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41	
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B	
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B	
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262	
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45	
92 Yellowish White	4.5y 9.2 1.2	#FFE2B7	
93 Yellowish Gray	3.8y 7.4 1.4	#CAA885	
94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B	
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F	
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112	

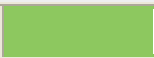
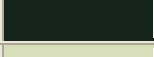
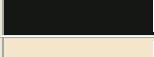
ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

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	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Yellow Green, Olive Green			
115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00	
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A	
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18	
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17	
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A	
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940	
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698	
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B	
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500	
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300	
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B	
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16	
127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D	
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A	
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Yellowish Green			
130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E	
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430	
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F	
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800	
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90	
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7	
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B	
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26	
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712	
Green			
139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34	
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A	
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C	
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524	
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793	
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E	
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646	
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27	
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C	
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA	
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A	
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E	
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830	
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	

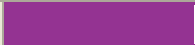
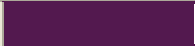
ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Bluish Green			
158 Vivid Bluish Green	5.0bg 5.0 13.0	#00836E	
159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76	
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B	
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B	
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4	
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85	
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556	
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33	
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18	
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
Greenish Blue			
168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C	
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E	
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7	
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0	
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E	
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B	
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841	
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Blue			
176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD	
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4	
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A	
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55	
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7	
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF	
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778	
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137	
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA	
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192	
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C	
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337	
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E	
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF	
190 Light Bluish Gray	8.2b 7.5 1.0	#BEADA1	
191 Bluish Gray	8.9b 5.5 0.9	#7D746D	
192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544	
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719	
Purplish Blue			
194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E	
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B	
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389	
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F	
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAACC7	
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2	
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63	
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A	
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5	
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E	
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Violet			
205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE	
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A	
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A	
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935	
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1	
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99	
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964	
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B	
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF	
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D	
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B	
Purple			
216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391	
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC	
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75	
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50	
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35	
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE	
222 Light Purple	6.2p 6.5 6.5	#BA7FA2	
223 Moderate Purple	6.6p 4.5 7.1	#7F4870	
224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F	
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21	
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1	
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#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	

ตารางที่ 23 แสดง The NBS/IBCC Color System (ต่อ)

Reddish Purple			
236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059	
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B	
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349	
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736	
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A	
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566	
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A	
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F	
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580	
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D	
Purplish Pink, Purplish Red			
246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB	
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E	
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284	
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF	
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090	
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574	
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA	
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293	
254 Vivid Purplish Red	7.6rp 4.9 13.6	#D5265B	
255 Strong Purplish Red	7.3rp 4.4 11.4	#B32851	
256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035	
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027	
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853	
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31	
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A	
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070	
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852	
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7	

264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894	
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066	
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D	
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313	

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 24 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสูตรโปรโตมัยลิตที่แยกได้จากดินรอบรากหน่อไม้ฝรั่ง

Strain NO.	Inhibition zone (mm)						
	<i>C. albican</i> ATCC 10231	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>R. solanacearum</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. citri
HP12-6	-	-	++	+	-	-	-
HP12-11	-	-	+	+++	++	-	++
HP21-10-22	-	-	++	-	++	++++	++++
HP21-12-3	-	-	-	-	-	+++++	++++
HP21-12-5	-	-	-	-	-	-	++++
HP22-10-2	-	-	-	-	-	-	-
HP22-10-7	-	-	-	-	-	-	+
HP22-11-4	-	-	-	-	-	-	-
HP22-11-8	-	-	+++	-	+++	+	+++
HP22-13-18	-	-	-	-	-	-	-
HP13-2	-	-	+	++	+++	-	+++
HP13-12	-	-	-	-	-	-	-
U12-1	-	-	-	-	-	-	-
U13-5	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ++++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) มากกว่า 50 มิลลิเมตรขึ้นไป

+++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 41- 50 มิลลิเมตรขึ้นไป

++++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 31 -40 มิลลิเมตร

+++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 21-30 มิลลิเมตร

++ = ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 11-20 มิลลิเมตร

+

= ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 1-10 มิลลิเมตร

- = ไม่ยับยั้ง

ภาคผนวก จ

Alignment: D:\7-22.fas

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50
PKB32-7-22 CTAATACCGA ATAGGACCTG GCCTCGCATG AGGCTGGGTG GAAAGTTTTT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      60      70      80      90     100
PKB32-7-22 CGGCCTGGGA TGGGCTCGCG GCCTATCAGC TTGTTGGTGG GGTGATGGCC

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     110     120     130     140     150
PKB32-7-22 TACCAAGGCG ACGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGCGACC GGCCACACTG

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     160     170     180     190     200
PKB32-7-22 GGA CTGAGAC ACGGCCGAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     210     220     230     240     250
PKB32-7-22 GCACAATGGG CGGAAGCCTG ATGCAGCGAC GCCGCGTGAG GGATGACGGC

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     260     270     280     290     300
PKB32-7-22 CTTGCGGTTG TAAACCTCTT TCAGCAGGGA CGAAGCGTAA GTGACGGTAC

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     310     320     330     340     350
PKB32-7-22 CTGCAGAAGA AGCGCCGGCC AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAGACGT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     360     370     380     390     400
PKB32-7-22 AGGGCGCGAG CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGAGC TCGTAGGCGG

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     410     420     430     440     450
PKB32-7-22 CTTGTGCGGT CGACTGTGAA AACCCGAGC TCAACTGCGG GCCTGCAGTC

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     460     470     480     490     500
PKB32-7-22 GATACGGGCA GGCTAGAGTT CGGTAGGGGA GACTGGAATT CCTGGTGTAG

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     510     520     530     540     550
PKB32-7-22 CCGTGAAATG CGCAGATATC AGGAGGAACA CCGGTGGCGA AGGCGGGTCT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     560     570     580     590     600
PKB32-7-22 CTGGGCCGAT ACTGACGCTG AGGAGCGAAA GCGTGGGGAG CGAACAGGAT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     610     620     630     640     650
PKB32-7-22 TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCTGTAAACG TTGGGCGCTA GGTGTGGGGG

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     660     670     680     690     700
PKB32-7-22 GCCTCTCCGG TTCCCTGTGC CGCAGCTAAC GCATTAAGCG CCCCGCCTGG

```

	
	710 720 730 740 750
PKB32-7-22	GGAGTACGGC CGCAAGGCTA AAAC TCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC
	
	760 770 780 790 800
PKB32-7-22	AAGCGGCGGA GCATGCGGAT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCT
	
	810 820 830 840 850
PKB32-7-22	GGGTTTGACA TGGCCGCAAA ACTCGCAGAG ATGTGAGGTC CTCGGGGGC
	
	860 870 880 890
PKB32-7-22	GGTCACAGGT GGTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTT

ภาพที่ 12 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PKB32-7-22

Alignment: D:\PKB32-24.fas

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      10      20      30      40      50
PKB32-24 CTCAGGACGA ACGCTGGCGG CGTGCTTAAC ACATGCAAGT CGAGCGGAAA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      60      70      80      90     100
PKB32-24 GGCCCTTCGG GGTACTCGAG CGGCGAACGG GTGAGTAACA CGTGAGTAAC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     110     120     130     140     150
PKB32-24 CTGCCCTGA CTCTGGGATA AGCCTGGGAA ACCGGGTCTA ATACCGGATA

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     160     170     180     190     200
PKB32-24 GACTCGCATG GTGGGTGGAA AGTTTTTTCG GTTGGGGATG GGCTCGCGGC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     210     220     230     240     250
PKB32-24 CTATCAGCTT GTTGGTGGGG TGATGGCCTA CCAAGGCGAC GACGGGTAGC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     260     270     280     290     300
PKB32-24 CGGCCTGAGA GGGCGACCGG CCACACTGGG ACTGAGACAC GGCCAGACT

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     310     320     330     340     350
PKB32-24 CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGC GCAATGGGCG GAAGCCTGAC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     360     370     380     390     400
PKB32-24 GCAGCGACGC CGCGTGGGGG ATGACGGCCT TCGGGTTGTA AACCTCTTTC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     410     420     430     440     450
PKB32-24 AGCAGGGACG AAGTTGACGT GTACCTGTAG AAGAAGCGCC GGCTAACTAC

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     460     470     480     490     500
PKB32-24 GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGCG CGAGCGTTGT CCGGAATTAT

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     510     520     530     540     550
PKB32-24 TGGGCGTAAA GAGCTCGTAG GTGGCTTGTT GCGTCTGCCG TGAAAGCCCG

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     560     570     580     590     600
PKB32-24 TGGCTTAAC TACGGGTCTGC GGTGGATACG GGCAGGCTAG AGGCTGGTAG

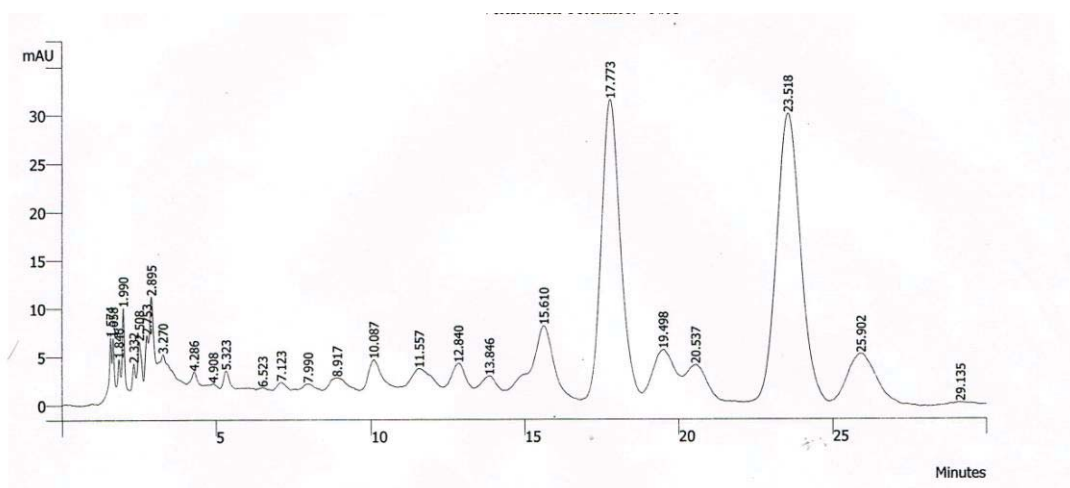
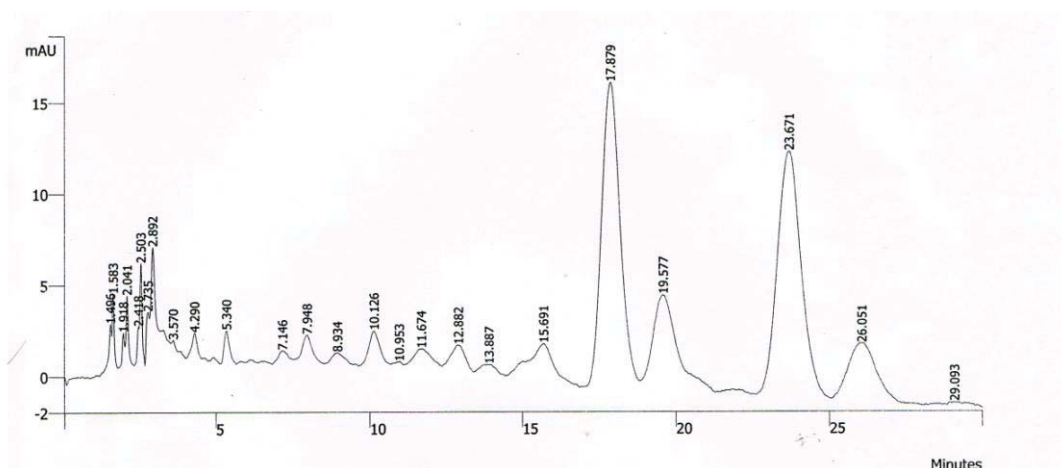
      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     610     620     630     640     650
PKB32-24 GGGCAAGCGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGCAGA TATCAGGAGG

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     660     670     680     690     700
PKB32-24 AACACCGGTG GCGAAGGCGG CTTGCTGGGC CAGTTCTGAC GCTGAGGAGC

```

PKB32-24	 710720730740750 GAAAGCGTGG GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCTGTA
PKB32-24	 760770780790800 AACGTTGGGC GCTAGGTGTG GGGGTCTTCC ACGATTCCTG TGCCGTAGCT
PKB32-24	 810820830840850 AACGCATTAA GCGCCCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG CTAAAACTCA
PKB32-24	 860870880890900 AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGC GGAGCATGTT GCTTAATTCG
PKB32-24	 910920930940950 ACGCAACGCG AAGAACCTTA CCAAGGTTTG ACATACACCG GAAACACTCA
PKB32-24	 9609709809901000 GAGATGGGTG CCTCCTTTGG ACTGGGTGAC AGGTGGTGCA TGGCTGTCTG
PKB32-24	 10101020103010401050 CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT
PKB32-24	 10601070108010901100 TGTTCCATGT TGCCAGCACG CCCTTTGGGG TGGTGGGGAC TCATGGGAGA
PKB32-24	 11101120113011401150 CTGCCGGGGT CAACTCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA GTCATCATGC
PKB32-24	 11601170118011901200 CCCTTATGTC TTGGGCTGCA AACATGCTAC AATGGTCGGT ACAGAGGGTT
PKB32-24	 12101220 GCGATACCGT GAGGTGGAGC GAATCCCTT

ภาพที่ 13 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ PKB32-24



ภาพที่ 14 แสดงเมนาควิโนนของแอคติโนมัลลิตาฮาซาก

ชื่อ-สกุล	นางสาวลลิตา วังเงิน Miss. Lalida Vachangken
วัน เดือน ปีเกิด	20 มิถุนายน 2527
ที่อยู่ปัจจุบัน	427/2 ม. 8 ต. เขาใหญ่ อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี 76120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา
	เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
พ.ศ 2550	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยี
	ชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี
	บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยานิพนธ์	
ระดับปริญญาตรี	Prediction of Tertiary Structure of Anthocyanidin
	Synthase (ANS) from Camellia sinensis.
ระดับปริญญาโท	การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอสโคตินมัย
	สีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
การนำเสนอผลงานทางวิชาการ	
Poster presentation	
พ.ศ. 2554	ลลิตา วังเงิน, สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์, ชุตินา
	ลิ้มมัทวาริรัตน์ และ นุชยา อภิษฐ์เสถียร ไซติ. 2554.
	ฤทธิ์ต้านจุลชีพและลักษณะของแอสโคตินมัยสีที่
	หายากคัดแยกจากรากหน่อไม้ฝรั่ง(การประชุม
	วิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
	ครั้งที่ 2)