

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปลวกเป็นแมลงที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ โดยปลวกจะเป่าดินและถ่ายมูลอินทรีย์
ต่าง ๆ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหาร ซึ่งเป่าดินเนื่องจากจุลินทรีย์ในลำไส้หรือจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวก รวมทั้งเห็ด รา ที่พึ่งพาอาศัยอยู่กับปลวกภายในรังในลักษณะได้ประโยชน์ร่วมกัน ลำไส้ส่วนท้ายของปลวกเป็นบริเวณที่จุลินทรีย์ในลำไส้สลายโครงสร้างพอลิเมอร์ของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

แอกติโนมัยซีท (actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีความหลากหลายมากทางด้าน
สัณฐานวิทยา ทั้งการสร้างเส้นใยราบ เส้นใยชูและสปอร์ สกุลที่พบมากที่สุดคือ *Streptomyces* ซึ่งมี
เสนาและสปorangiospore คล้ายเชื้อรา พบว่ามีกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ มีมากในดิน ส
วนใหญ่มีความสำคัญทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม เนื่องจากเป่าดินจุลินทรีย์ที่
มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิประเภทสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มี
ประโยชน์หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (anti-microbial agent) สารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ในปศุสัตว์ (growth hormone/growth enhance) สารกันบูดในอาหาร (food preservative) เอนไซม์หลายชนิดที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เป่าดิน (Alexander, 1977; Goodfellow, 1985)

อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวกโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ผนังลำไส้ปลวก ต่อมา Pasti and Belli (1985) สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากลำไส้ปลวกซึ่งย่อยสลายเซลลูโลสได้ นอกจากนี้เชื้อแอกติโนมัยซีทยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกนิน Watanabe et al. (2003) ได้คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากลำไส้ของปลวกสายพันธุ์ต่าง ๆ (*Coptotermes*

formosanus, *Reticulitermes speratus*, *Neotermes koshunensis*, *Hodotermopsis japonica* และ *Odontotermes formosanus*) บนอาหาร defatted wood powder medium พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายโครงสร้างของลิกนิน และพบว่าประชากรเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวกถูกกำหนดโดยบริเวณหรือแหล่งที่อยู่อาศัยของปลวกเป็นหลัก ปลวกที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อแอกติโนมัยซีทจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของปลวก (Watanabe *et al.* , 2003)

รายงานเกี่ยวกับการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์หายากจากลำไส้ปลวกนั้นมีอยู่น้อย ซึ่งเชื้อแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์หายากหลายสกุลมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Lazzarini *et al.*, 2001) จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้เสนอโครงการวิจัยพบว่าสามารถ แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากปลวก ซึ่งได้เชื้อแอกติโนมัยซีทชนิดหายากและมีแนวโน้มที่จะเป็นสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หายากเพิ่มและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสาร ประกอบลิกนิน เซลลูโลสและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในกลุ่มหายากจากลำไส้ปลวกงาน
- 1.2.2.ทดสอบความสามารถย่อยสลายสาร ประกอบลิกนินเซลลูโลสและกรดยูริกของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้
- 1.2.3.ทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้

1.3. ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากลำไส้ปลวกงาน และค้นหาเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารลิกนินเซลลูโลส กรดยูริกและสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.4. นิยามศัพท์เฉพาะ

แอสโคไมซีต คือ แบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา มีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ มีการสร้างเส้นใย 2 แบบคือ substrate mycelium และ aerial mycelium

ปลวก ปลวกเป็นแมลงที่มีขนาดลำตัวเล็กมีหลายรูปร่างลักษณะ (polymorphism) ซึ่งอาศัยอยู่รวมกันเป็นสังคมภายในรังที่มีลักษณะเป็นสิ่งก่อสร้างเฉพาะ รังเป็นทั้งที่อยู่อาศัย เครื่องป้องกันภัย แหล่งเก็บสะสมอาหาร และรักษาสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของประชากรปลวกภายในรัง

สารประกอบลิกโนเซลลูโลส เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนประกอบด้วยสารพอลิเมอร์ชั้นปฐมภูมิ 3 ชนิดคือ ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยที่ส่วนผนังเซลล์ของพืชประกอบด้วย เซลลูโลสไมโครไฟบริล ซึ่งมีโครงสร้างทั้งที่เป็นผลึกและแบบอสัณฐานในปริมาณที่สูงอยู่ภายในเมทริกซ์ของลิกโนคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยลิกนินที่เป็นพอลิฟีโนลิก เชื่อมอยู่กับเฮมิเซลลูโลส

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง

16S rDNA คือโดเมนที่ ความผันแปรของสิ่งมีชีวิตพวก โปรคาริโอท นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันมากก็สามารถนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เชื้อแอสโคไมซีตประสิทธิภาพดีที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส และสารทดสอบชนิดอื่นๆ สามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอนาคต

ได้เชื้อแอสโคไมซีตประสิทธิภาพดีที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

1.6. กรอบแนวคิดในการวิจัย

ปลวกเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยแบบพึ่งพาเป็นจำนวนมากภายในลำไส้ อาหารที่ปลวกกินได้แก่วัสดุที่อุดมไปด้วยสารประกอบลิกโนเซลลูโลส จึงเป็นแหล่งที่ดีสำหรับการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส

กรดยูริกเป็นของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบไนโตรเจน จะสะสมในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ และขับออกจากร่างกายโดยปนมากับสิ่งขับถ่ายของปลวก แต่มีรายงานว่าปริมาณของกรดยูริกในอุจจาระเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เป็นไปได้ว่ากรดยูริกถูกจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ปลวกทำการย่อยสลาย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะค้นพบแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายกรดยูริก

นอกจากนี้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นิยมใช้ทางการค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีท โดยสกุลที่มีรายงานในการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ สเตรปโตมัยสีท แซคคาโรโพลีสปอรา และ ไมโครโมโนสปอรา เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากลำไส้ปลวก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยซีท

เชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั่วไปแล้วต้องการอากาศ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการอากาศหรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย แต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันมากตั้งแต่มีรูปร่างกลมและ/หรือเป็นแท่งที่มีการพัฒนาเป็นอย่างดี เชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา มีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ มีการสร้างเส้นใย 2 แบบคือ substrate mycelium และ aerial mycelium และสร้างโครงสร้างพิเศษเช่น sclerotium sporangia และ synnemata สมาชิกส่วนใหญ่มี %G+C content สูงกว่า 55% (Ruan,1994)

เชื้อแอคติโนมัยซีทต่างจากเชื้อราคือ มีขนาดเล็กและจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอตซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโทคอนเดรีย และผนังเซลล์มีมิวโคเปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วย n-acetyl muramic acid และ diaminopimeric acid, glutamic acid, glycerine และ alanine เป็นส่วนประกอบ (Davis, 1973) ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดยังมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันซึ่งได้จัดจำแนกไว้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 4 (1989)

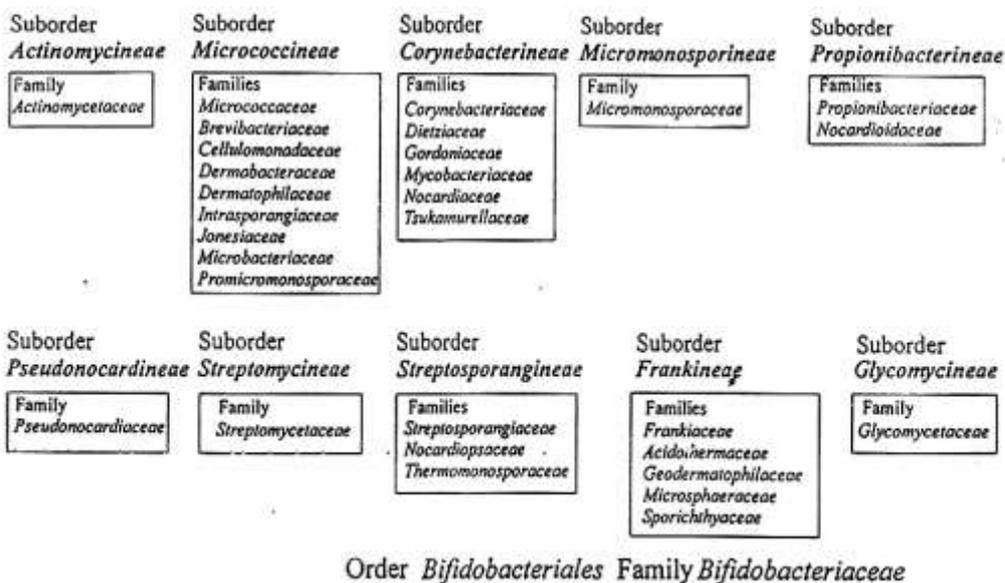
แอคติโนมัยซีทได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกเมื่อประมาณ 100 ปีก่อนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพิจารณาว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเส้นใยที่แตกกิ่งก้านได้ในบางระยะของการพัฒนา สามารถพบเชื้อแอคติโนมัยซีทกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน กองวัสดุที่เน่าเปื่อยและในน้ำ ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ และมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลาย สามารถย่อยสลายสารได้หลายชนิด บางชนิดมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกับพืชและสัตว์ และบางสายพันธุ์ก่อโรคในคน สัตว์ และพืช

2.2 การจัดหมวดหมู่โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

การจัดหมวดหมู่ของเชื้อแอคติโนมัยซีทตามความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA สามารถจัดออกเป็นกลุ่มโดยการศึกษาความสัมพันธ์ของแอคติโนมัยซีทในกลุ่มต่าง ๆ โดยอาศัยความคล้ายคลึงของ 16S rDNA จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 4 (1989) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถจัดออกเป็น 6 กลุ่มซึ่งประกอบด้วย Nocardioforms, Multilocular sporangia, Actinoplanetes, Maduromycetes, Thermomonospora ยกเว้นกลุ่ม Thermoactinomycetes ซึ่งมีความสัมพันธ์ที่ไม่ใกล้ชิดกับแอคติโนมัยซีทกลุ่มอื่น ๆ แต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus* มากกว่าโดยแสดงความสัมพันธ์ดังภาพที่ 1

Class *Actinobacteria*

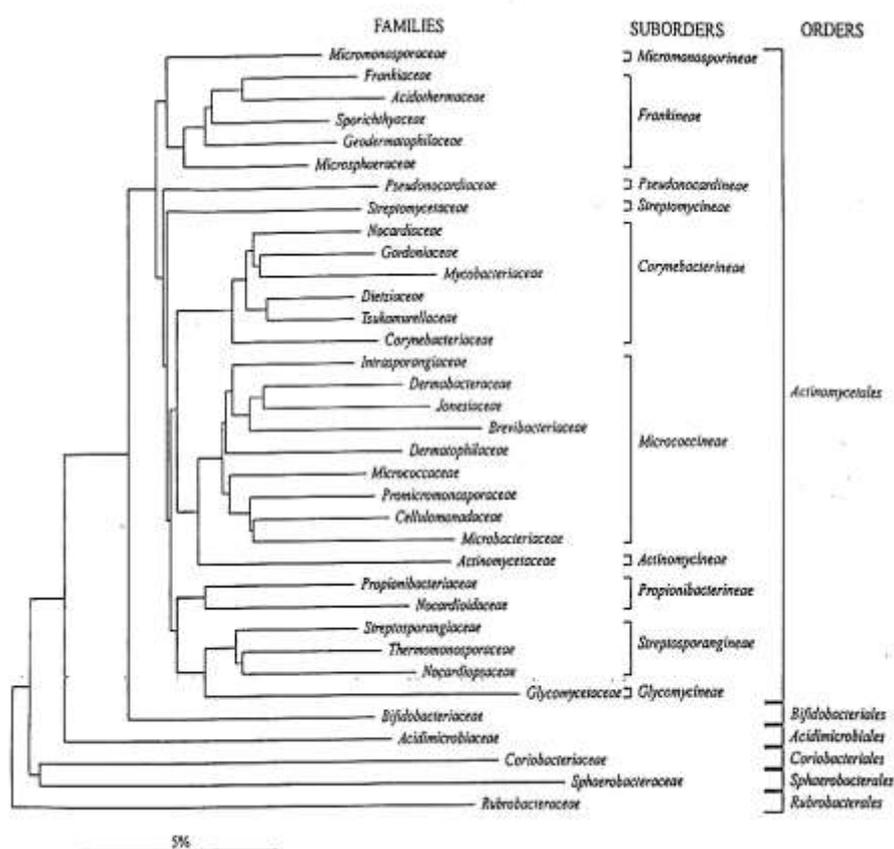
Subclass *Acidimicrobiae* Order *Acidimicrobiales* Family *Acidimicrobiaceae*
 Subclass *Rubrobacteridae* Order *Rubrobacterales* Family *Rubrobacteraceae*
 Subclass *Coriobacteridae* Order *Coriobacteriales* Family *Coriobacteriaceae*
 Subclass *Sphaerobacteridae* Order *Sphaerobacterales* Family *Sphaerobacteraceae*
 Subclass *Actinobacteridae* Order *Actinomycetales*



ภาพที่ 1 การจัดหมวดหมู่ของ Actinobacteria โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA

ที่มา: Stackebrandt *et al.* (1997)

การศึกษาความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA (Stackebrandt and Woese, 1981) แสดงให้เห็นว่าแอกติโนมัยสีทในปัจจุบันจะหมายรวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกที่มีอัตราส่วนของ G+C มากกว่า 55% mol (Goodfellow and Cross, 1983) ซึ่งจะรวมเอา *Corynebacterium* ไว้ในกลุ่มนี้ด้วย และแยก *Thermoactinomyces* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Bacillaceae* ออกจากกลุ่ม และได้มีการเสนอการการจัดหมวดหมู่แบบใหม่โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA โดย Stackebrandt *et al.* (1997) โดยแอกติโนมัยสีทจัดอยู่ในคลาส *Actinobacteria* วงศ์ *Actinomycetales* ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทในกลุ่มต่าง ๆ โดยอาศัยลำดับเบสบน 16S rRNA/rDNA

ที่มา: Stackebrandt *et al.*, 1997

การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนจานอาหารแข็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเลนส์ที่มีระยะการทำงานยาว (long working objective lens) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการเพาะเลี้ยงแบบ slide culture โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกมีดังนี้

1. เส้นใย (mycelium) เส้นใยมีลักษณะคงตัวหรือบางชนิดเป็นแบบชั่วคราว เมื่อโครงสร้างนี้สลายตัวไปจะสามารถสังเกตเห็นวัตถุที่อยู่ภายใน และบางครั้งก็อาจมีการเคลื่อนที่ เส้นใยมี 2 ลักษณะคือ เส้นใยชูในอากาศ (aerial mycelium) และเส้นใยราบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) หรือในบางสายพันธุ์สร้างเฉพาะเส้นใยราบ หรือเส้นใยชูเพียงอย่างเดียวก็ได้

2. โคนิเดีย (conidia) คือสปอร์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งแตกต่างไปจาก คลามัยโดสปอร์ (Chlamydospore) และสปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างโคนิเดียได้ในหลายลักษณะดังนี้

2.1 โคนิเดียเดี่ยว เป็นสปอร์เดี่ยว ๆ มักพบได้ทั่วไปตัวอย่างเช่นในสกุล *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharopolyspora* เป็นต้น นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนร้อน เช่น สกุล *Thermomonospora* บางสายพันธุ์เป็นเอนโดสปอร์ที่ไม่ทนร้อน เช่น *Saccharomonospora* และ *Promicromonospora* นอกจากนี้สมาชิกในสกุล *Frankia* *Dactylosporangium* และ *Intrasporangium* จะสร้าง vesicle ทำให้เกิดความสับสนเนื่องจากคล้ายคลึงกับสปอร์เดี่ยว

2.2 โคนิเดียที่มีลักษณะเป็นคู่ มีการเรียงตัวตามยาวสร้างอยู่บนเส้นใยชู ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทในสกุล *Microbispora*

2.3 โคนิเดียเรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ มีจำนวนสปอร์ 20 สปอร์ ตัวอย่างสกุลที่มีการสร้างโคนิเดียในลักษณะนี้ได้แก่ *Norcadia*, *Pseudonorcadia*, *Faenia*, *Saccharomonospora*, *Streptoverticium*, *Sporichthya*, *Actinomadura* และ *Microtetraspora*

2.4 โคนิเดียเรียงตัวเป็นสายยาว มีจำนวนสปอร์ได้ถึง 50 สปอร์ พบได้ในเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสกุลรวมทั้ง *Norcadia*, *Norcadoides*, *Pseudonorcadia*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* และ *Streptoverticillum*

3. โครงสร้างอื่น ๆ แอคติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะพิเศษต่าง ๆ เช่น บางชนิดสร้างกลุ่มของสปอร์ที่แกนของเส้นใย การสร้างสปอร์แบบนี้เรียกว่า multilocular sporangia

แอคติโนมัยสีทหลายชนิด สร้างโครงสร้างที่มีลักษณะกลม ขนาดไม่ใหญ่นักบนเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ ลักษณะเป็นเส้นใยที่ม้วนบิดเป็นวงกลมในสายสปอร์หรือโครงสร้างนี้อาจจะมีเส้นใยฝังลงไป โครงสร้างที่มีรูปร่างไม่แน่นอนเช่น sclerotium สร้างโดย *Streptomyces* บางชนิดจะไม่มีสปอร์อยู่ภายใน แต่จะมีไขมันอยู่แทน

2.3 บทบาทของเชื้อแอคติโนมัยสีทในการย่อยสลายสารประกอบลิโกลินเซลลูโลส

เชื้อแอคติโนมัยสีทมีบทบาทในธรรมชาติคือ ความสามารถในการสังเคราะห์สารในกลุ่มที่เป็นสารปฏิชีวนะ บางชนิดสามารถปล่อยเอนไซม์พวกโปรติเอสออกมาทำลายแบคทีเรีย ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทยังมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย ในช่วงที่มีอินทรีย์วัตถุในดินมากจะมีจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย และเชื้อราเจริญอยู่มาก ส่วนเชื้อแอคติโนมัยสีทจะเจริญตามมาในภายหลังเพราะว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญเติบโตได้ช้า และจะเจริญได้ดีเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้วคือในช่วงที่มีสารประกอบที่ทนทานต่อการย่อยสลายเหลืออยู่มาก แอคติโนมัยสีทหลายชนิดจะช่วยกันย่อยสลายสารพวก แป้ง, อินนูลิน, ไคติน, เซลลูโลส, ลิกนิน, พาราฟิน, ฟีนอล และไพริมิดีน เป็นต้น เชื้อแอคติโนมัยสีทบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 12 มิลลิกรัมต่อกรัม ของเซลลูโลสที่ใช้ไป นอกจากนี้ยังมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้คือ *Frankia* (วิทยา, 2536)

2.3.1 การย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส

องค์ประกอบของไม้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศ และมีศักยภาพอย่างยิ่งในการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอโนไซม์ที่นำไปใช้ประโยชน์ในอาหารสัตว์ หรือเป็นทางเลือกสำหรับการใช้ทดแทนสารเคมีในอุตสาหกรรม การฟอกเยื่อกระดาษ เพื่อลดสารประกอบลิกนิน เป็นต้น (McCarthy, 1987) สารประกอบลิกโนเซลลูโลส มีลักษณะเป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วยสารพอลิเมอร์ขั้นปฐมภูมิ 3 ชนิดคือ ลิกนิน, เซลลูโลส, และเฮมิเซลลูโลส โดยที่ส่วนผนังเซลล์ของพืชประกอบด้วย เซลลูโลสไมโครไฟบริล ซึ่งมีโครงสร้างทั้งที่เป็นผลึกและแบบอสัณฐานในปริมาณที่สูงอยู่ภายในเมทริกซ์ของลิกโนคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยลิกนินที่เป็นพอลิฟีนอลิก เชื่อมอยู่กับเฮมิเซลลูโลส (Lai and Sakanen, 1971 และ Atuchi *et al.*, 1984) การย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแบบ *in-situ* มีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากธรรมชาติของโครงสร้าง สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารพอลิเมอร์

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีปริมาณมากที่สุด (30-45% w/w) สารประกอบเฮมิเซลลูโลสมีอยู่ประมาณ 20-40% W/W สามารถเรียกได้อีกอย่างว่าเป็นกลุ่มของเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่แตกแขนง (branched heteropolysaccharide) เช่น อะราบิโนไซแลน

Haider and Trojanowski (1975) และ Crawford (1976) ได้ศึกษาการย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นลิกนินและเซลลูโลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทในห้องปฏิบัติการด้วย ^{14}C ลิกโนเซลลูโลส พบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถเข้าทำลายลิกโนเซลลูโลสได้ในรูปที่เป็นธรรมชาติ (native form) โดยได้มีผู้ทำการศึกษาศักยภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีอยู่ตามธรรมชาติเช่น Crawford (1978) และ Phelan *et al.* (1979) ศึกษาการย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นลิกนินและเซลลูโลสของไบโเมเปิลโดยเชื้อ *Streptomyces* Trojanowski *et al.* (1977) และ Haider (1978) ศึกษาการย่อยสลายซังข้าวโพดโดยเชื้อ *Nocardia* McCarthy and Broda (1984) ศึกษาการย่อยสลายลิกนินในข้าวสาลีโดยแอคติโนมัยซีททั่ว ๆ ไป

Atkey and Wood (1983) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนเนื้อไม้ พบว่ามีการย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชและพบการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในปύเยหมักที่เกิดขึ้นจากบทบาทของเชื้อแอคติโนมัยซีทเช่นเดียวกับเชื้อรา โดยเกิดขึ้นทั้งในระยาะอุณหภูมิห้อง (mesophilic) และในระยาะที่มีอุณหภูมิสูง (thermophilic) ของกระบวนการย่อยสลายปύเยหมัก

2.3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะบางประการที่คล้ายคลึงกันคือ เป็น พอลิเมอร์ที่เป็นสายตรง (linear polymer) ของ β 1-4 linked sugar residual และว่องไวต่อปฏิกิริยาการสลายด้วยกรดและเอนไซม์ ตัวอย่างของสารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่เป็นที่รู้จักคือ ไส้แลน โดยไส้แลนจะมี 4-O-methyl-D-glucuronic acid และ L-arabinose เป็นสายด้านข้าง แมคโครโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีโครงสร้างซับซ้อน มีลักษณะเป็นผลึกซึ่งไม่ละลายน้ำและทนทานต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชัน (depolymerizing) ด้วยเอนไซม์และสารเคมี ในธรรมชาติเซลลูโลสจะรวมอยู่กับเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้ยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสโดยการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสออกมาในสิ่งแวดล้อมซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิดที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายแมคโครโมเลกุลของเซลลูโลส ตัวอย่าง เช่น เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) จะย่อยสลายเซลลูโลสแบบสุ่มได้เป็นกลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายที่ปลาย non reducing ได้เป็นเซลโลไบโอส จากนั้นเซลโลไบโอส จะถูกย่อยสลายต่อไปด้วยเอนไซม์เซลโลไบเอส (cellobiase) เป็นกลูโคส (Ryu and Mandel, 1980) และเอนไซม์ เบต้าไฮลาเนสจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* TISTR 3465 ย่อยสลายไส้แลนแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นไฮโดรไบโอส (Khucharoenphaisan *et al.*, 2010b) เชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ดินชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกนินเซลลูโลส เช่น เอนไซม์เซลลูเลส ตัวอย่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้แก่เชื้อแอกติโนมัยซีทในสกุล *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces* และ *Streptomyces* (MaCarthy, 1987)

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเอนไซม์ที่ต้องเหนี่ยวนำ (inducible extracellular enzyme) และมีบทบาทการทำงานเหมือนเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทในสกุล *Thermomonospora* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ pH ประมาณ 6.0 และทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส (Moreira *et al.*, 1981) ส่วนเชื้อแอกติโนมัยซีทกลุ่มมีโซฟิลิก (mesophilic) ที่มีช่วงการเจริญที่อุณหภูมิห้องสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่ *S. antibioticus*, *S. flavogriseus* และ *S. viridosporus* โดยแอกติโนมัยซีทกลุ่มมีโซฟิลิกนี้จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5-7

เชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) เช่น เชื้อ *T. curvata* และสายพันธุ์ที่เป็น mesophilic *S. flavogriseus* ได้นำมาใช้ในการศึกษากันมาก ในปี 1972 Stutzenberger ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *T. curvata* พบว่า ผลิตภัณฑ์เอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมต่อ cotton fiber และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) และกิจกรรมที่ได้จากเอนไซม์ที่ผลิตออกมามีกิจกรรมต่อ ground cotton fiber ได้เป็นเซลโลไบโอส ต่อมา Stutzenberger and Kahler (1986) พบว่ากลูโคสไม่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสใน *Thermoactinomyces*

Stutzenberger and Lupo (1986) พบว่า *T. curvata* ผลิตปล่อยเอนไซม์เซลลูเลส complex บางชนิดซึ่งสามารถเกิด saccharifying เซลลูโลสที่มีโครงสร้างแบบผลึก โดยความสามารถในการ saccharifying ของเอนไซม์จะถูกยับยั้งได้อย่างรวดเร็วโดยการให้ความร้อนในสภาวะที่เป็นกรด ในขณะที่สภาวะเป็นด่างจะกระตุ้นการเกิด cellolytic complex เกิดขึ้นโดย heat treatment ดังนั้น thermal activation step อาจเกี่ยวข้องกับวิธีการเพิ่มกิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลสของ *Thermoactinomyces* ส่วน *S. flavogriseus* สามารถผลิตเอนไซม์ที่ผลิตออกภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนได้ในปริมาณมาก (MacKenzie et al., 1984) รูปแบบหนึ่งของเอนไซม์คือ เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 45000 และ *pI* 4.15 เอนไซม์นี้มีกิจกรรมต่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแต่ไม่สามารถย่อยสลาย acid swollen cellulose ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์คือ เซลโลไบโอส

Sinma et al. (2008) แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากลำไส้ของปลวกหน้าดิน (*Termes comis* และ *Pericapritemes longignathus*) ปลวกที่กินหญ้า (*Speculitermes* sp.) ปลวกกินไม้ (*Microcerotermes* sp.) และปลวกที่สร้างสวนเห็ด (*Macrotermes gilvus*) ได้เชื้อจำนวน 160 ไอโซเลทที่สามารถย่อยไซแลนได้ และอีก 60 ไอโซเลทสามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Sinma et al., 2007) นอกจากเชื้อ *Streptomyces* และ *Thermomonospora* แล้วยังพบว่า *Micromonospora* สามารถย่อยสลายเซลลูโลส Sandrak (1977) พบว่ามีปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora* ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสสูงถึง 3×10^3 ต่อ 1 กรัมของดินบริเวณรากต้นข้าวสาลีในขณะที่ Johnson and Cross (1976) พบว่า สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora* ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากไม้ที่ผุพัง

เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสคือ เอนไซม์ไซลาเนส โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้แก่ *S. flavogriseus*, *S. lividans* และ *Streptomyces* sp. สารประกอบไซแลนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในเชื้อ *T. lanuginosus* TISTR 3465 ได้ 19.8 U/ml ในขณะที่ไซโลโกลิกแซ็กคาไรด์ และไซโลส มีผลต่อการเหนี่ยวนำน้อยกว่าคือ 1.10 และ 0.37 U/ml ตามลำดับ เมื่อใช้น้ำตาลอะราบินอส กลูโคส และไซโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ในปริมาณต่ำ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อใช้น้ำตาลกาแล็กโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของไซแลนที่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส ได้ดีที่สุด คือ 10-15 mg/ml โดยเชื้อรานี้สร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้ 16.2 U/ml (Khucharoenphaisan *et al.*, 2010a)

การแช่เยื่อกระดาษในเอนไซม์ไซลาเนสก่อนการฟอกขาวสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษได้ โดยทำให้สารเคมีแทรกซึมเข้าสู่ลิกนินออกได้ดีขึ้น เป็นการลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ลดปริมาณสาร Adsorbable Organic Halogens (AOX) ที่ทำให้น้ำเสีย และทำให้เยื่อกระดาษมีความขาวมากขึ้น (Buchert *et al.*, 1994) การแช่เยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *T. lanuginosus* สามารถลดค่า Kappa number ได้ 1.4 unit และเพิ่มความขาวของเยื่อได้เป็น 33.1% หากนำเยื่อฟอกด้วยวิธี peroxide extraction สามารถลดค่า Kappa number ได้เป็น 5.7 unit และเพิ่มความขาวของเยื่อได้เป็น 45.2% (Khucharoenphaisan *et al.*, 2000)

2.3.3 การย่อยสลายสารประกอบลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีความทนทานมากที่สุดมีความแตกต่างของพอลิเมอร์และประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่เป็นสารอะโรมาติก 3 ชนิดเชื่อมต่อกันด้วย พันธะ β -aryl-ether linkage (Peterson *et al.*, 1984) โดยมีการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกนินโดยจุลินทรีย์กันมากในเชื้อรา *Phaenerochaete chrysosporium* ส่วนใน จุลินทรีย์ชนิดอื่นพบว่ากลุ่มของโปรคาริโอตได้แก่ แอคติโนมัยซีทและ anaerobic clostidia มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบนี้ (McCarthy, 1987) ตัวอย่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ย่อยสลายลิกนินได้แก่เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*

และ *Arthrobacter* (Crawford and Sutherland, 1977; Kuster, 1979; McCarthy and Broda, 1984; McCarthy, 1987)

เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* สามารถย่อยสลายลิกนินและสารประกอบโมโนเมอร์ที่เป็นสารอะโรมาติก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโครงสร้างที่เป็นหน่วยของสาร ประกอบพีนอลสำหรับการรวมตัวเป็นฮิวมัส ดังนั้นแอคติโนมัยซีทจึงมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดฮิวมิกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยศึกษาจากการปลดปล่อยสารประกอบลิกโนคาร์โบไฮเดรตในรูปที่ละลายน้ำได้ออกมาจากฟางข้าวโดยกิจกรรมของเชื้อ *T. mesophila* นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* ก็สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกนินได้เช่นเดียวกัน

การย่อยสลายลิกนินโดยเชื้อ *Streptomyces* เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ-ดีพอลิเมอร์ไรเซชัน (oxidative depolymerization) กับสารประกอบลิกนินเช่นเดียวกับการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์พืช ปฏิกิริยา ดีพอลิเมอร์ไรเซชันที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการตัดแปลงลิกนินเป็นรูปแบบที่ละลายน้ำได้คือ acid precipitable polymeric lignin (APPL) โดยได้มีรายงานถึงสารมัธยันต์ที่เกิด ขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยสลายลิกนินมีชื่อว่า acid-precipitate polyphenolic polymeric lignin (APPL) สะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สาร APPL เป็นลิกนินที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปและเป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำที่ประกอบด้วยสารประกอบผสมของโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุล $\geq 20,000$ และสามารถตกตะกอนได้ที่ $\text{pH} \leq 3-5$ สาร APPL ที่ผ่านการย่อยสลายแล้วจะมีกลุ่มของฟีนอลิก-ไฮดรอกซี (phenolic hydroxy) เป็นจำนวนมาก แต่มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ในปริมาณน้อยรวม ทั้งมีการทำลายพันธะที่ α -carbonyl และหมู่คาร์บอกซิล การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการอากาศเพื่อใช้ในการทำลายการเชื่อมต่อนของ *p*-hydroxy ether และหมู่เมทอกซี (methoxy group) ในลิกนิน ดังนั้น APPL จึงเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นต้นจากการย่อยสลายลิกนิน

Jeffrey *et al.* (1983) ศึกษากระบวนการย่อยสลายสารจำพวกสารประกอบลิกนินโดยใช้สีที่มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ (polymeric dye) 3 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกับลิกนินมาเป็นโมเดลในการศึกษา ได้แก่ Poly B-411, Poly R-481 และ Poly Y-606 โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้ทดแทนคาร์บอน 14 ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตภาพรังสี (^{14}C radiolabeled) ข้อดีของสีทั้ง 3 ชนิดก็คือ ละลายได้ง่ายและมีความคงตัว ราคาไม่แพง และมีการผลิตในทางการค้าจึงมีความบริสุทธิ์สูง มีความเป็นพิษต่ำต่อเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Streptomyces cyaneus* มีการเจริญบนฟางข้าวและปลดปล่อย inducible extracellular protein ที่เกี่ยวข้องในละลายลิกนิน และได้ APPL เป็นผลิตภัณฑ์ และต่อมา McCarthy(1987) พบว่ามี แอคติโนมัยสีทอีกหลายสายพันธุ์ เช่น *T. mesophila* สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสและได้ผลิตภัณฑ์ เป็น APPL เช่นเดียวกัน หลังจากนั้น ได้รายงานการพบเอนไซม์เอกทราเซลลูลาร์ลิกนินเปอร้ออกซิเดสที่ผลิต โดยเชื้อ *Streptomyces viridosporus* T7A ได้มีศึกษาการย่อยสลายลิกนิน พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยก ได้จากลำไส้ปลวกนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกนินได้ดีกว่า *S. viridosporus* T7A และมีสมบัติทางเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

Zimmermann (1990) รายงานชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ปลวกและมีความสามารถในการทำลายโครงสร้างของลิกนิน ได้แก่ *Pseudomonas Acinetobacter Corynebacterium Flavobacterium Nocardia Rhodococcus* และ *Streptomyces* แต่จุลินทรีย์เหล่านี้มีอัตราการย่อยสลายที่ช้ามาก เมื่อทำการศึกษาโดยการให้อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหาร พบว่าอาหารที่ปลวกกินจะ อยู่ภายในลำไส้เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง (Breznak, 1984) ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สั้นมากในการทำลายพอลิเมอร์ของลิกนินซึ่งมีความซับซ้อน ในขณะที่อนุภาคของเนื้อไม้ผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหารของปลวก จะเกิดการเพาะเชื้อ (inoculate) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์และเริ่มการสลายโครงสร้างของลิกนินทันทีในสภาวะที่มี อากาศใกล้ ๆ บริเวณเยื่อผนังลำไส้ (paunch epithelium) กระบวนการย่อยสลายนี้จะเกิดไปพร้อม ๆ กับ จุลินทรีย์อื่นที่อยู่นอกลำไส้ปลวก อาหารที่ปลวกกินเข้าไปนั้นจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นมูลและหมุ่นเวียนนำมูล กลับมาใช้ใหม่ซึ่งอาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายไม้

Khucharoenphaisan และคณะ (2011) รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท ที่แยกได้จากลำไส้ปลวก สามารถย่อยสลายสับเสตรที่ได้หลายชนิดคือ ไชแลน แป้ง แป้งมัน โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส เมื่อเลี้ยงบน อาหารรุ้น

2.3.4 การออกซิไดซ์กรดยูริก

เอนไซม์ยูเรตออกซิเดส (Urate oxidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์กรดยูริก เป็นอลันโทอิน (allantoin) ในสภาวะที่มีอากาศ การทำงานของเอนไซม์ ยูเรตออกซิเดสจะเกิดขึ้นใน 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกเกิดการออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ได้เป็นสารตัวกลางซึ่งจะถูกเปลี่ยนรูปไปโดยปฏิกิริยาที่ไม่

เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non enzymatic reaction) ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เอนไซม์ยูเรตออกซิเดสพบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์หลายชนิดโดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายพิวรีนและกรดยูริกในสภาวะที่มีอากาศ (Vogel and Van der Drift, 1976) ต่อมา Ohe and Watanabe (1980) พบว่าเชื้อ *Streptomyces cyanogenus* ซึ่งแยกจากดินสามารถผลิตเอนไซม์ยูเรตออกซิเดส ที่มีลักษณะเป็นเอนไซม์เหนียวน้ำ (inducible enzyme) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100,000 ประกอบด้วย 3 สับยูนิต แต่ละสับยูนิตมีน้ำหนักโมเลกุล 32,000

Watanabe *et al.* (1969) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สามารถผลิตเอนไซม์ยูเรตออกซิเดสได้ในปริมาณสูง เมื่อป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดยูริก หรือไฮโปแซนทีนเป็นตัวเหนียวน้ำ (inducer) และเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

กนกกร และคณะ (2548) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากลำไส้ของปลวกหน้าดิน (*Termes comis* และ *Pericapritemes longignathus*) ปลวกที่กินหญ้า (*Speculitermes* sp.) ปลวกกินไม้ (*Microcerotermes* sp.) และปลวกที่สร้างสวนเห็ด (*Macrotermes gilvus*) สามารถ ออกซิไดซ์กรดยูริกได้ 162 ไอโซเลท

Khucharoenphaisan และ Sinma (2011) สามารถแยกเชื้อ แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Saccharopolyspora* sp. PNR11 และสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. (Khucharoenphaisan และ Sinma, 2010c) ที่มีสมบัติในการออกซิไดซ์กรดยูริก จากลำไส้ปลวก

2.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังผลิตสารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Waksman and Lechevalier, 1962; Goodfellow *et al.*, 1988, Lazzarini *et al.*, 2000) จากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด มาจากเชื้อรา 42% *Streptomyces* 32.1% แบคทีเรียอื่นๆ 10.8% และแอคติโนมัยสีทที่หายาก 15.1% เฉพาะสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8000 ชนิด พบว่าผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* 45.6% ผลิตจากเชื้อรา 21.5%

จากเชื้อแบคทีเรีย 16.9% และแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์หายาก 16% ซึ่งสามารถจัดจำแนกออกได้เป็น *Micromonosporaceae* 38.1% *Pseudonocardiaceae* 15% *Thermomonosporaceae* 14% *Nocardia* 11% *Streptosporangiaceae* 6% *Nocardioidea* 2.6% และอื่นๆอีก 13.3% (Lazzarini et al., 2000)

สารปฏิชีวนะที่พบส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* หลายชนิดซึ่งได้แก่สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น ampicillin และ penicillin-N โดยมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β -lactam) ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. clavuligerus* สามารถผลิต Clavams (Muller et al., 1983) ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส (β -lactamase) ที่ผลิตโดย *Staphylococci* และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และ Neomycin ซึ่งผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman et al., 1964) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งและกลมบางชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางชนิดและยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย สารที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราได้แก่ Nystatin, Polyoxin, และ Amthracycline นอกจากนี้เป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้ว ยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ด้วย โดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลอง DNA ได้ (Goodfellow et al., 1988) สารต่อต้านเชื้อราและยีสต์ที่พบใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นสารพวก polyene (Ball et al., 1957) มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อราและยีสต์ แต่มักไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Norman et al., 1972) ซึ่งมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อราและยีสต์โดยเข้าจับกับ sterol ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เซลล์สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ (Hamilton-Miller, 1973) โดยสารต่อต้านเชื้อราที่พบได้ใน *Streptomyces* มีหลายชนิดเช่น Blasticidin S ซึ่งผลิตโดย *S. griseochromogens* (Takeuchi et al., 1958) Kasugamycin ผลิตโดย *S. kasugaensis* (Sato, 1983) และ polyoxin D ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* (Isono and Suzuki, 1979) เป็นต้น

มีการนำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาใช้ในการควบคุมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในพืชเช่น *Streptomyces lydicus* WYEC108 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสซึ่งมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงมีการนำมาใช้ควบคุมเชื้อราโรคพืชอย่างกว้างขวาง นอกจากเอนไซม์โคติเนสแล้ว แอคติโนมัยสีทชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อราและสารต่อต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ ดังนั้นจึงมีการใช้เชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดนี้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับรากและเมล็ดของพืช (Mahadevan and

Crawford, 1997) จากการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในตระกูล Alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถป้องกันการเกิดโรคใบจุดของพืชในกลุ่มนี้ได้ ดังนั้นจึงได้นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบราก (Samac et al., 2003) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษา *Streptovercillium albirectiuli* ซึ่งมีสมบัติต่อต้านเชื้อราก่อโรคที่อยู่ในดินเช่น *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น ซึ่งมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ควบคุมเชื้อราโรคพืชต่อไป (Park et al., 2002) ในขณะที่ วชิร (2544) ได้ทำการคัดแยกแอสโคดิโนมัยีสท์ที่สร้างสารที่สามารถต่อต้านเชื้อรา *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรค anthracnose ในพืช พบเชื้อแอสโคดิโนมัยีสท์ที่มีความสามารถดังกล่าวจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยเป็น *Streptomyces* ทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ Fungichomin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินในกะหล่ำปลีซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Shih et al., 2003)

2.4.1 สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอสโคดิโนมัยีสท์ สารที่ผลิตได้นี้สามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือมีฤทธิ์ไปทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆ ได้ (มาลิน, 2540)

สารปฏิชีวนะเป็นสารอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเช่น *Penicillium notatum* ผลิต penicillin, *Cephalosporium acremonium* ผลิต cephalosporin และ *Streptomyces griseus* ผลิต Streptomycin ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะสังเคราะห์สารชนิดต่างๆ ขึ้น โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ primary metabolite และ secondary metabolite สาร primary metabolite ถูกสร้างขึ้นในช่วง primary metabolism เป็นช่วงที่มีการสังเคราะห์สารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตเช่น deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, protein, lipid และ polysaccharides ปฏิกริยาต่างๆของ primary metabolism มีความสมดุลและไม่มีการสะสม สำหรับสาร secondary metabolite เป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ สารปฏิชีวนะถูกสร้างขึ้นในช่วงนี้จะมีประโยชน์เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดภายในเซลล์ได้ จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่อยู่ร่วมกับจุลินทรีย์

ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องมีการแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดได้ จึงช่วยให้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารนี้มีการแข่งขันเพื่อมีชีวิตรอดอยู่ได้ในธรรมชาติ (มาลิน, 2540) จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น สารปฏิชีวนะเป็นหนึ่งใน secondary metabolite ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อบางกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมี 2 ชนิดคือ

1. ชนิดที่เป็นพิษเฉพาะต่อเชื้ออื่น (xenotoxic antibiotic) สารปฏิชีวนะชนิดนี้มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้ออื่นเท่านั้นเช่น Cyloheximide ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. griseus* ไม่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแต่มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ ยูคาริโอต (eukaryote) เช่น เชื้อรา โปรโตซัวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขณะที่ Penicillin G ซึ่งผลิตจาก *P. chrysogenum* จะมีฤทธิ์เฉพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย

2. ชนิดที่เป็นพิษต่อตัวเอง (autotoxic antibiotic) สารปฏิชีวนะพวกนี้สามารถเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้นได้เช่นกันกับมีพิษต่อจุลินทรีย์อื่นเช่น Streptomycin ซึ่งผลิตจาก *S. griseus* เชื้อชนิดนี้ไวต่อ Streptomycin แต่ความไวนี้เกิดในช่วงระยะเวลาหนึ่งของการเจริญ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะในลักษณะนี้จึงต้องหลีกเลี่ยงการทำลายตัวเองโดยสร้างกลไกการต่อต้านขึ้นในช่วงขณะผลิตสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเป็นสารเมทาบอลไลต์ขั้นที่สอง (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเมทาบอลไลต์ที่ไม่มี ความจำเป็นต่อการเจริญ ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง idiophase ของการเจริญ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารปฏิชีวนะมักเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

2.4.2 การกระจายตัวของจุลินทรีย์ที่ผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์

จากการสำรวจของ antibiotic literature database (ABL) ในจำนวนผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 23000 ชนิดซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น antifungal antibacteria antiviral antitumor cytotoxic และ immune suppressive แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์หลักที่สามารถผลิตสารเหล่านี้คือเชื้อรา (~42%) รองลงมาคือเชื้อ *Streptomyces* (32.1%) ส่วนแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นที่นอกเหนือจาก *Streptomyces* ผลิต 15.1% ซึ่งแอคติโนมัยสีทกลุ่มนี้ก็คือ rare actinomycetes

นอกเหนือจาก *Streptomyces* แล้ว แอคติโนมัยสีทสกุลอื่นๆ ก็มีความสำคัญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น *Amycolatopsis mediterranei* (rifamycin), *Sacharopolyspora erythraea*

(erythromycin) นอกจากนี้ยังมี teicoplanin (*Actinoplanes teichomyceticus*) vancomycin (*Amycolatopsis orientalis*) และ gentamycin จาก *Micromonospora purpurea* (Lancini & Lorenzetti, 1993)

ในกลุ่มของแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์หายาก นั้นพบว่าจุลินทรีย์ในออร์เดอร์ *Actinomycetales* นอกเหนือจาก *Streptomyces* แล้ว สกุลที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับรองลงมาได้แก่แฟมิลี *Micromonosporaceae* โดยสกุลหลักๆคือ *Micromonospora* และ *Actinoplanes* แฟมิลี *Pseudonocardiaceae* หลักๆได้แก่ *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora* และ *Saccharothrix* นอกจากนี้ยังมีแฟมิลี *Thermomonosporaceae* (*Actinomadura*) *Nocardiaceae* (*Nocardia*) และแฟมิลี *Streptosporangiaceae* (*Streptosporangium*) ในส่วนของ marine actinomycetes พบว่า *Salinispora* พบว่าสามารถผลิตสารเมทาบอลไลท์ที่หลากหลายซึ่งมี biological activity ที่ต่างกัน

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่สำคัญต่อการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ โดยในกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่ผลิตเพื่อการค้าในปัจจุบัน พบว่าเป็นผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียเพียงกลุ่มเล็กๆเท่านั้น ในกลุ่มของแบคทีเรียพบว่า *Streptomyces* มีบทบาทสำคัญ โดยตัวอย่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้แก่สกุล *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora* เป็นต้น สารเมทาบอลไลท์ทุติยภูมิผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* มีฤทธิ์ทางชีวภาพกว้าง โดยสกุล *Streptomyces* สกุลเดียวผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด *Streptomyces* ได้ถูกคัดแยกจากตัวอย่างดินมาเป็นเวลานานเพื่อจุดประสงค์สำหรับคัดแยกเชื้อทำให้โอกาสที่จะค้นพบแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ลดลงไปด้วย พบว่าเชื้อ แอกติโนมัยซีทมากกว่า 500 สปีชีส์ ผลิตสารเมทาบอลไลท์คิดเป็น 70-80% ของสารเมทาบอลไลท์ที่ค้นพบ ซึ่งในจำนวนนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเพียงไม่กี่สกุลเช่น *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ในปัจจุบันจำเป็นต้องค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆ เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อก่อโรคซึ่งไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยยาที่มีอยู่ในปัจจุบัน ทำให้อัตราการเสียชีวิตเนื่องจากความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคมียิ่งขึ้น

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้นเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดื้อยา แอกติโนมัยซีทที่มีอยู่ในทะเลคิดเป็น 10% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในตะกอนใต้ทะเลและสามารถแยกจากตะกอนใต้ทะเลได้ แอกติโนมัยซีทหลายชนิดซึ่งแยกจากกันทะเลลึกพบว่ามีเอนไซม์ non-ribosomal polyketide synthase (NRPS) และ polyketide synthase (PKS) pathway ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการ

ผลิตสารเมทาบอลไลท์ทุติยภูมิ *Rhodococcus marinonascens* เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดแรกที่แยกได้จากทะเล นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทยังถูกแยกมาจาก free swimming เช่นเดียวกับสัตว์มีเซลล์ชนิดที่มีและไม่มีกระดูกสันหลังตัวอย่างเช่น *Micrococcaceae*, *Dermatophilaceae* และ *Gordoniaceae* แยกมาจากฟองน้ำทะเล (sponge) และ Actinomycetes ที่ผลิต tetrodotoxin แยกได้จากรังไข่ของปลาปักเป้าซึ่งพบว่ามีควมใกล้เคียงกับ *Nocardiosis dasonvillei*

นักวิจัยได้พยายามค้นหาแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่จากทะเลด้วยวิธีการขั้นพื้นฐานและค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ตัวอย่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทซึ่งได้ทำการระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงและเทคนิคทางพันธุศาสตร์จากระบบนิเวศทางทะเลต่างๆได้แก่ *Actinomadura Actinosynnema Amycolatopsis Arthrobacter Blastococcus Brachyacteria Corynebacterium Dietzia Frankia Frigoribacterium Geodermatophilus Gordonia Kitasatospora Micromonospora Micrococcus Microbacterium Mycobacterium Nocardioides Nocardiosis Nonomurea Pseudonocardia Rhodococcus Saccharopolyspora Salinispora Serinicoccus Solwaraspora Streptomyces Streptosporangium Tsukamurella Turicella Verrucosispora และ Williamsia อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการปรับปรุงวิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์หายากจากทะเล แต่ก็พบว่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้*

2.4.3 บทบาทของสารเมทาบอลไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

2.4.3.1 การยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

Fogacin เป็นสารปฏิชีวนะชนิด octaketide ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ TU-6319 มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้ง *B. subtilis* (Radzom *et al.*, 2006) ส่วนเชื้อ *Actinomadura* A40926 ก็มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม glycoprotein มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Neisseria* (Goldstein *et al.*, 1987) Chandramycin ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces lydicus* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Clostridium perfringens* และ *Clostridium septicus* (Singh and Gurusiddaiah, 1984) Okilactomycin เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม lactone ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces griseoflavus* มีฤทธิ์อ่อนๆในการยับยั้ง *S. aureus* และ *S. pyogenes* (Imai *et al.*, 1987) Chimomycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ในกลุ่ม

angucyclinone มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. faecium* สารชนิดนี้สกัดได้จากเชื้อ *Nocardia mediterranei* subsp. *kanglensis* 174764 (Sun *et al.*, 2007) สารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้าง $C_{26}H_{31}N_2O_5Cl$ ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces aculeolatus* มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้ง *S. aureus* และ *S. epidermis* (Shomura *et al.*, 1987)

สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ซึ่งมีชื่อว่า M92 ผลิตจากเชื้อแอกติโนมัยซีตสกุล *Micromonospora* พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด (Tany *et al.*, 1982) ส่วนสารปฏิชีวนะชนิดเปปไทด์ที่ผลิตจาก *Microbispora* sp. SNA-115 มีฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้ง *M. phlei* และ *X. oryzae* (Kimura *et al.*, 1996) สารปฏิชีวนะชนิด β -lactem มีชื่อว่า Nocardicin A สกัดมาจาก *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis* ATCC 21806 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อเชื้อ *Proteus* และ *Pseudomonas* (Aoki *et al.*, 1976) ส่วนสารปฏิชีวนะชนิดใหม่สองชนิดได้แก่ A21459 A และ B ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น cyclic peptide ผลิตจากเชื้อ *Actinoplanes* sp. พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ยับยั้ง clostridia, mycoplasma และแบคทีเรียแกรมลบ (Selva *et al.*, 1996) Frogocyclinone เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ในกลุ่ม angucyclinone ซึ่งแยกมาจากเชื้อ *Streptomyces griseus* NTK 97 สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Bruntnet *et al.*, 2005)

เชื้อ *Streptomyces niveoruber* FSPNRU 102 ที่แยกจากลำไส้ปลวก ก็มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ ยีสต์ *Candida utilis* (Khucharoenphaisan *et al.*, 2012)

2.4.3.2 การยับยั้งเชื้อรา (Antifungal activity)

Brasinolide A เป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ในกลุ่ม macrolide ที่ผลิตจากเชื้อ *Nocardia brasiliensis* IFM0406 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ดี (Tanaka *et al.*, 1997) ส่วนเชื้อ *Streptomyces* strain SD581 พบว่าผลิต AB023 ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม polyene ที่มีความซับซ้อน และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืช (phytopathogenic fungi) ทั่วไปมีฤทธิ์ยับยั้ง *Botrytis cinerea* (Cidaria *et al.*, 1993) ส่วน Oligomycin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม macrolide ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces libani* ก็พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อร่าก่อโรคได้ดี (Kim *et al.*, 1999)

เชื้อ *Streptomyces halstedii* K122 ผลิต bafilomycin B1 และ C1 ซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อราเป้าหมายได้ดี (Frandsberg *et al.*, 2000) ส่วน isochainin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม macrolide polyene ซึ่งคัดแยกมาจากเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทสายพันธุ์ Ap1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* และ *Verticillium dahlia* (Bouizgarne *et al.*, 2006)

2.4.3.3 การยับยั้งโปรโตซัว (Antiprotozoa activity)

Coronamycin เป็นสารปฏิชีวนะชนิดเปปไทด์ชนิดใหม่ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทชนิดเอนโดไฟท์ซึ่งแยกมาจาก epiphytic vine *Monstera* sp. จากบริเวณ Manu region ในเขตอเมซอนทางตอนเหนือของเปรู สารปฏิชีวนะชนิดนี้พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้าน *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็น malaria parasite (Ezra *et al.*, 2004) ส่วนสารประกอบ munumbicins A, B, C และ D เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่ฤทธิ์อย่างกว้างต่อเชื้อก่อโรคในมนุษย์และเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช รวมทั้งเชื้อ *Plasmodium* sp. ด้วย โดยสารชนิดนี้ผลิตจาก *Streptomyces* NRRL 3052 ซึ่งเป็นเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทชนิดเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร snakevine (*Kennedia nigriscans*) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย นอกจากนี้สาร Munumbicins D พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นพาราไอท์ของเชื้อมาลาเรีย (Castillo *et al.*, 2002)

2.4.3.4 การยับยั้งนีมาโทด (Anthelmintic activity)

การค้นพบว่าเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทมีความสามารถเป็นเชื้อก่อโรคในนีมาโทด แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการนำไปใช้เป็น biocontrol agent ต่อต้าน parasitic nematode *Streptomyces avermitilis* ผลิตสารที่มีชื่อว่า Ivermectin ซึ่งค้นพบในประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1970 ซึ่งต่อมาได้นำมาค้นหาสารเมทาบอลไลท์จากจุลินทรีย์ชนิดนี้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันและนำไปสู่การค้นพบสาร antiprotozoals และ anthelmintic ชนิดใหม่รวมถึงยาต้านมาลาเรียด้วย (Kita *et al.*, 2007)

Doramectin เป็นสารต้านนีมาโทดในกลุ่ม Avermectin โดยผลิตจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces avermitis* ส่วน Moxidectin เป็น macrocyclic lactone ชนิดใหม่ ซึ่งผลิตจากเชื้อ

Streptomyces cyanogriseus noncyanogenus ทั้ง Doramectin และ Moxidectin ได้ถูกนำมาใช้ต่อต้าน gastrointestinal nematode ในหลายรูปแบบ (Ayaz and Sahin, 2003)

จากการศึกษาพบว่า *Streptoverticillium albireticuli* มีฤทธิ์อย่างแรงในการต้านเชื้อนีมาโทดต่อต้าน *C. elegans* (Park et al., 2002) สารประกอบชนิดใหม่จำนวน 3 ชนิดได้แก่ Thaimycins A B และ C ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces michigaensis* var. amylolyticus var. nova มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวและยับยั้งนีมาโทดทั้งในระดับ in vivo และ in vitro (Cassinelli et al., 1970)

2.4.3.5 การยับยั้งไวรัส (Antiviral activity)

มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อ marine actinomycetes จำนวน 20 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งโรคจุดขาวใน penaeid shrimp ซึ่งเกิดจาก White Spot Syndrome Virus ในจำนวนนี้พบว่ามีจำนวน 6 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี (Kumar et al., 2006) สารปฏิชีวนะชนิดใหม่มีชื่อว่า AM-2604 A ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. AM-2604 พบว่ามีฤทธิ์อ่อนๆ ในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อ *Trichomonad* รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งได้หลากหลายทั้ง RNA และ DNA virus ในระดับ in vitro (Omura et al., 1982)

SF2487 เป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่แยกได้จากเชื้อ *Actinomaura* sp. SF2487 พบว่ามีฤทธิ์อย่างอ่อนต่อแบคทีเรียแกรมบวกและมีฤทธิ์เป็น antiviral ชนิด influenza virus แบบ in vitro (Hatsu et al., 1990)

เชื้อ *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกจาก Brazillian tropical forest soil มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งกระบวนการ propagation ของ acyclovir-resistant HSV type I strain ของ HEp-2 cell นอกจากนี้สาร pentalacton ซึ่งสกัดจาก *Streptomyces* sp. M-2718 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง DNA virus ได้หลายชนิด (Sacrament et al., 2004)

2.4.3.6 ออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง (Insecticidal activity)

แอคตินโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงโดยชีววิธี (Biological control) จากการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง พบว่าเชื้อแอคตินโนมัยซีทมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Culex*

quinquefasciatus (Sundarapandian *et al.*, 2002) นอกจากนี้เอนไซม์โคติเนสซึ่งผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์หายากในสกุล *Actinoplanes* สามารถใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ ต่อแมลงศัตรูพืชที่มีโคตินเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ที่ cuticle ของมัน โดยได้มีการทดลองใช้ในเขต Arabian gulf (Gadelhak *et al.*, 2005) การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลทซึ่งแยกได้จากดินในการต่อต้านตัวอ่อนระยะที่สามของ house fly *Musca domestica* พบว่าเชื้อ *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* เป็นสกุลที่มีประสิทธิภาพที่สุด (Ghazal *et al.*, 2001) สารปฏิชีวนะ macrotetralide ซึ่งได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces aureus* ด้วย acetone โดยเชื้อสายพันธุ์นี้แยกจากดินที่เก็บจากจังหวัดไซตามะ ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *Callosdofruchus chinensis* (Oishi *et al.*, 1970)

สารสกัดด้วย ethyl acetate จากเชื้อ *Streptomyces* sp. KN-0647 ซึ่งแยกจากตัวอย่างดินในป่า Dali Cangshan mountain, จังหวัด Yunnan ประเทศจีน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแมลงก่อโรค *Spodoptera exigua*, *Dendrolimus punctatus*, *Plutella xylostella*, *Aphis glycines* และ *Culex pipiens* โดยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งนี้ได้ถูกแยกและระบุว่าเป็น Quinomycin A (Liu *et al.*, 2008)

เชื้อ *Streptomyces* sp. 173 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลและตะกอนใต้ทะเล มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์รุนแรงต่อ brine shrimp และ *H. armigera* เช่นเดียวกับ avermectin B1 (Xiong *et al.*, 2004)

2.4.3.7 ออกฤทธิ์สารยับยั้งมะเร็ง (Cytotoxic activity)

สารประกอบที่มีชื่อว่า Retymicin, Gentamycin B และ Saquayamycin Z ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ TU6368 มีฤทธิ์เป็น cytostatic ต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิด (Antal *et al.*, 2005) ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ Algacidin A และ B ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* sp. RK-1339 มีฤทธิ์ยับยั้ง เซลล์ Yoshida sarcoma cell (Kihara *et al.*, 1983) ส่วนยาปฏิชีวนะ Okicenone ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. K03599 ซึ่งแยกจากดินในประเทศญี่ปุ่นพบว่ามีสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Funayama *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังมีสาร macrolide ชนิดใหม่อีก 7 ชนิดที่มีชื่อว่า Pladienolides ผลิตโดยเชื้อ *Streptomyces plutensis* MER-110 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ human glioma cells ในการทดลองแบบ in vitro รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง tumor cell proliferation (Sakai *et al.*, 2004)

Chimomycins เป็นสารในกลุ่ม angucycline ชนิดใหม่ที่ผลิตจากเชื้อ *Nocardia mediterranei* subsp. *kanglensis* 174764 มีฤทธิ์ยับยั้ง human colorectal cancer cell และ oesophageal carcinoma cells (Sun *et al.*, 2007) สาร Elloxazinones A และ B มีฤทธิ์เป็นสารต้านเซลล์มะเร็งโดยยับยั้ง Hepatocellular carcinoma เซลล์ และ Human breast carcinoma cell โดยพบว่าผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseus* ACT2871 (Graf *et al.*, 2007) Okilactomycin เป็นสารในกลุ่มแลคโตนซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseoflavus* มีฤทธิ์ยับยั้ง ascites carcinoma ในหนู (Imai *et al.*, 1987)

พบว่าสารบางชนิดเช่น Chandramycin ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces lydicus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งผลของ cytotoxic ในหนูได้ Victomycin ซึ่งจัดว่าเป็นส่วนหนึ่งของ Pleomycin-Bleomycin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเซลล์มะเร็งพบว่าผลิตโดยเชื้อ *Streptosporangium violaceochromogenes* sp. nov. เชื้อ *Streptomyces* sp. DO-116 ผลิตสารยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใหม่ชื่อว่า Sapurimycin โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเซลล์มะเร็งโดยมีผลต่อ leukemia P388 และ Sarcoma 180 ในหนู (Singh and Gurusiddaiah, 1984)

2.4.3.8 ออกฤทธิ์เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant activity)

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา นักวิจัยได้เห็นถึงความสำคัญต่อบทบาทของอนุมูลอิสระ (free radicals of oxygen) ที่มีต่อโรคหลายชนิด จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการค้นหาสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์ พบว่า carbazomycin B ซึ่งเป็นทั้งยาปฏิชีวนะและสารยับยั้งแบคทีเรียยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย (Kato, 1994) นอกจากนี้ยังค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการคัดเลือกจากเชื้อ *Streptomyces prunicolor* โดยใช้ต้นหนูเป็นระบบในการตรวจวัดกิจกรรมได้สารสองชนิดที่เป็นแอนติออกซิแดนซ์ชนิดใหม่ได้แก่ Benthocyanins A B และ C และ Benthophoenin

สาร Carquinostatin A จากเชื้อ *Streptomyces exfoliates* พบว่ามีฤทธิ์ปกป้องสมอง โดยทำการทดลองใน rat liver microsome พบว่าออกฤทธิ์ได้ดีเทียบเท่ากับวิตามินอี นอกจากนี้ยังมีผลต่อระบบประสาทโดยมีฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษของ glutamate (Shinya, 1994) เชื้อ *Streptomyces* sp. OH-1049 ผลิตสารแอนติออกซิแดนซ์ชนิด isoflavonoids โดยสารที่มีชื่อว่า 4',7,8-trihydroxyisoflavone มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Funayama *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกเชื้อ endophytic actinomycete จากพืชสมุนไพรสามชนิดได้แก่ *Annonaceae squamosal* *Camptotheca acuminata*

และ *Taxus chinensis* พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 10.7% จากทั้งหมด 150 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งอนุมูลอิสระได้ (Wu *et al.*, 2009)

2.4.3.9 ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Antiinflammatoty activity)

การทดลองแบบ *in vitro* พบการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบด้วย 5,7,4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin และ 5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 โดยนำมาทดสอบการเกิดขึ้นของ NO, PGE₂ และ TNF- α รวมทั้งศึกษาเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, iNOS) และ ไซโคลออกซีจีเนส-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำใน murine macrophge RAW 246.7 cell (Taechowisan *et al.*, 2007)

สารประกอบ polyether ที่มีชื่อว่า dianemycin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* sp. MT 2705-4:KCTC 8651P พบว่ามีประสิทธิภาพยับยั้งการอักเสบที่หนูทดลองซึ่งเกิดจาก ear edema ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย croton-oil หรือ arachidonic acid (Lee *et al.*, 1997)

สารยับยั้งการอักเสบชนิดใหม่ 5 ชนิดได้ค้นพบจากเชื้อ *Streptomyces phaeochromogenes* LL-P018 (Graziani *et al.*, 2005) จากการค้นพบการยับยั้งการอักเสบใน *in vitro* ของ lansai C โดยมีบทบาทเป็น anti-inflammatory agent นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเพปไทด์สายสั้นอีกสามชนิด ซึ่งแยกได้มาจากมารีนแอคติโนมัยสีท *Streptomyces* sp. CNB-091 (Taechowisan *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 1999)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลวกชนิดปลวกงาน (worker) สายพันธุ์ *Termes comis* (ปลวกกินดิน) จากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกกราช จ.นครราชสีมา

3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

แยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทจากลำไส้ปลวกงาน จำนวน 20 ตัวต่อ 1 ชุดการทดลอง ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่วางอยู่บนถ้ำน้ำแข็ง ผ่าเชื้อที่พื้นผิวลำตัวของปลวกด้วย 70% เอทานอล เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นจึงเจือจางต่อด้วยสารละลาย 6% yeast extract และ 0.05% SDS ให้มีความเข้มข้น 1:100 บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเจือจางสารละลายตัวอย่างต่อไปด้วยน้ำกลั่น (Nonomura และ Hayakawa, 1988) ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร humic acid vitamin agar ซึ่งเติมไซโครเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) โนวोไบโอติน (novobiotin) ทูนิคามายซิน (tunicamycin) ไรฟาปีซิน (rifampicin) คลอเตตราไซคลิน (chlortetracycline) ฟีนอล (phenol) และนาลิดิซิก (nalidixic acid) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีเฉพาะสำหรับแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่หายาก โดยแบคทีเรียชนิดอื่นจะมีปริมาณลดน้อยลงมาก บ่มเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ เมื่อเชื้อมีการเจริญปรากฏขึ้นบนโคโลนี่จึงใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนี่ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลากเป็นเส้นตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 (yeast extract- malt extract) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหารเอียง (slant) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3. การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสและกรดยูริก

นำเชื้อแอสเพอร์จิลลินที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์หายาก ที่แยกได้ทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารต่างๆ

3.3.1 การย่อยสลายลิกนิน (การออกซิไดซ์ไกวอะคอล)

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินที่หลงบนอาหารแข็ง ISP2 (yeast extract-malt extract) ที่มีการเติมไกวอะคอล (guaiacol) ความเข้มข้น 0.01% บ่มจนเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และสังเกตความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน จากการเกิดบริเวณสีน้ำตาลแดงรอบ ๆ โคลินี่ ซึ่งบริเวณที่มีสีน้ำตาลแดงนี้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกนิน

3.3.2 การย่อยสลายเซลลูโลส

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินที่หลงบนอาหารแข็ง cellulose agar ที่เติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC; Carboxymethylcellulose, Sigma, U.S.A.) ความเข้มข้น 1% บ่มจนเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีอาหารแข็งด้วยสารละลายคองโกเรด (congo red) ที่ง้วนาน 5 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนไม่มีสีของคองโกเรดหลุดออกมา สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลินี่

3.3.3 การย่อยสลายไซแลน

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินที่หลงบนอาหารแข็งไซแลน (xylan medium) บ่มจนเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และสังเกตความสามารถในการย่อยสลายไซแลนจากการเกิดบริเวณใสและย้อมสีอาหารแข็งด้วยสารละลายคองโกเรด (congo red) ที่ง้วนาน 5 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกินออก

ด้วยสารละลายไซเตียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนไม่มีสีของคองโกเรดหลุดออกมา สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลิनी

3.3.4 การออกซิไดซ์กรดยูริก

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิโนมัยสีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 (yeast extract-malt extract) ที่มีการเติมกรดยูริก (uric acid, Merck) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน yeast extract และปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยไซเตียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอโมลล์ บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และสังเกตความสามารถในการออกซิไดซ์กรดยูริกจากการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคลิनी

3.3.5 การย่อยสลายเซลลูโลสชนิดไม่ละลายน้ำ

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิโนมัยสีทลงบนอาหารแข็ง avicel agar ที่เติม อะไวเซลเซลลูโลส (avicel, Sigma, U.S.A.) ความเข้มข้น 1% บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีอาหารแข็งด้วยสารละลายคองโกเรด (congo red) ที่ง้วนาน 5 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายไซเตียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนไม่มีสีของคองโกเรดหลุดออกมา สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลิनी

3.3.6 การย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำ (soluble starch)

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิโนมัยสีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 ที่เติม soluble starch ความเข้มข้น 1% บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีอาหารแข็งด้วยสารละลายไอโอดีน สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลิनी

3.3.7 การย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch)

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิตินอไมด์สีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 ที่เติม แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 1% บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีอาหารแข็งด้วยสารละลาย ไอโอดีน สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลไอนี้

3.3.8 การย่อยสลายไขมัน (tween 80)

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิตินอไมด์สีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 ที่เติม tween 80 ความเข้มข้น 1% ร่วมกับ CaCl_2 บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเกิดตะกอนบริเวณรอบ ๆ โคลไอนี้

3.3.9 การย่อยสลายโปรตีน (sodium caseinate)

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแอสคิตินอไมด์สีทลงบนอาหารแข็ง ISP2 ที่เติม sodium caseinate ความเข้มข้น 1% บ่มจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคลไอนี้

3.4 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

นำเชื้อแอสคิตินอไมด์ มาศึกษาการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* และยีสต์ คือ *Candida utilis* ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการขีดทับซึ่งดัดแปลงจากวิธี Cross streak plate (Waksman, 1959) ทำการเขี่ยเชื้อแอสคิตินอไมด์บนอาหาร ให้เป็นเส้นตรง บริเวณกึ่งกลางของจานอาหาร ISP medium No. 2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อมีการเจริญดี จากนั้นขีดเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิดลงบนจานอาหารที่มีเชื้อแอสคิตินอไมด์เจริญดี โดยลากจากกริมโคโลนีของแอสคิตินอไมด์

ไปยังขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น และบันทึกผล

3.5 การจัดทำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

3.5.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

เพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีท ลงบนอาหาร ISP medium No. 2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-3 สัปดาห์ จนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐาน เส้นใยในอากาศ (aerial mycelium) เส้นใยราบในอาหาร (substrate mycelium) และการสร้างเม็ดสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (soluble pigment) ที่เจริญบนจานอาหารแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุชนิด long-working objective lens (Olympus) และสังเกตสีของโคโลนี และการสร้างเม็ดสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.2 การจัดทำแนกเชื้อแอสคิโนมัยซีทโดยการหาลำดับ 16S rDNA

3.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทสายพันธุ์คัดเลือกลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง นำเซลล์สด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดไมโครพิพพ์ สกัด DNA ด้วยชุด Genomic DNA purification kit (Fermentas, Germany) โดยเติมสารละลาย Lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงเก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนในหลอดไมโครพิพพ์ และเติมสารละลาย precipitating solution ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนตะกอนดีเอ็นเอละลายหมดแล้วเติมเอทานอล 100% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่เย็นแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เทสารส่วนใสทิ้งแล้วจึงล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงแล้วเทส่วนใสทิ้งไป ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งในอากาศ หลังจากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ pH 8.0 เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA ตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของ ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยก โดยดูการละลายแมกนีเซียมปริมาณ 50 μ l มาวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Beckman DU-530) ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 220-280 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์

3.5.2.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain reaction, PCR) ในปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 73.8 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 pmol ต่อไมโครลิตร 2 ชนิดได้แก่ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') ปริมาตรชนิดละ 12 ไมโครลิตร สารละลายผสมของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (dNTPs mixed) ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 9.6 ไมโครลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Qiagen, Germany) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร สารละลายจะมีปริมาตรรวมเป็น 120 ไมโครลิตร แบ่งสารผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 9 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด PCR เต็มตัวอย่างดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 ng ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ปิดฝาให้สนิทแล้วผสมให้เข้ากัน นำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง PCR thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมการทำงานที่เวลาและอุณหภูมิเป็นลำดับดังนี้คือ

- | | |
|-----------------------------|--------|
| 1. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 5 นาที |
| 2. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| 3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| 4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที |

5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

10 นาที

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงานเก็บ PCR product ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเร่ง (PCR) ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการจากการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ O' Range Ruler 100 bp DNA marker (Fermentas, USA) ที่รู้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แน่นอน

3.5.2.3 ตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งผงอะกาโรสแล วดล วย TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (1x, 0.004M Tris-acetate, 0.001M EDTA) โดยใส ความร อยจนละลายหมด รอยจนกระทั่ง นที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล วยเทเจล ลงบน tray ที่เสียบ comb ใส เจลมีความหนา 3-5 มิลลิเมตร แล วยรอยจนกระทั่งเจลแข็งประมาณ 30-45 นาที เอาหัวเสียบหรือ comb ออกจากเจล นำเจลไปแช วย ใน electrophoresis tank ที่บรรจุ TAE บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันปริมาณ 2 ไมโครลิตร ด้วย loading sample ที่ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาณ 8 ไมโครลิตร loading dye ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยกระบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความต างศักย 100 โวลต เป นเวลา 30 นาที จนกระทั่ง loading buffer เคลื่อนที่มาจนเกือบสุดเจล หยุดการอิเล็กโทรโฟรีซิส และป ดเครื่อง จากนั้นย อย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ethidium bromide (Nacalai Tesque) 10 นาที แล วย ethidium bromide ส วยน้ำกลั่นหนึ่งม วย นเวลา 5-10 นาที แล วยนำไปส วยแสง อัลตราไวโอเลตด วยเครื่อง UV transilluminator ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะทำให้ สามารถมองเห็นแถบของดีเอ็นเอ ทำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดNucleoSpin[®] Extract (Macherey Nagel, Germany)

3.5.2.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

16S rDNA

ทำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด NucleoSpin[®] Extract (Macherey Nagel, Germany) โดยผสม PCR product ที่ได้กับบัฟเฟอร์ NT 2 ปริมาตร 4 เท่าของ PCR product จากนั้นจึง load ลงบน silica membrane ที่มีหลอดเก็บสารละลายอยู่ด้านล่าง บั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ลอดผ่าน membrane ทิ้งไป จากนั้นจึงทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ลอดผ่าน membrane จากนั้นจึงล้างครั้งที่ 2 ด้วยบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g นาน 2 นาที เทสารละลายที่ลอดผ่าน membrane ทิ้งไป ตั้ง membrane ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่า membrane จะแห้งแล้วจึงชะดีเอ็นเอออกจาก membrane ด้วย NE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ส่งตัวอย่าง PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MacroGen Laboratories ประเทศเกาหลี หาลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator V3.0 Cycles Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้ จะนำมาตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งก่อนนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอกับข้อมูลดีเอ็นเอของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อใช้ ในการระบุสายพันธุ์

บทที่ 4

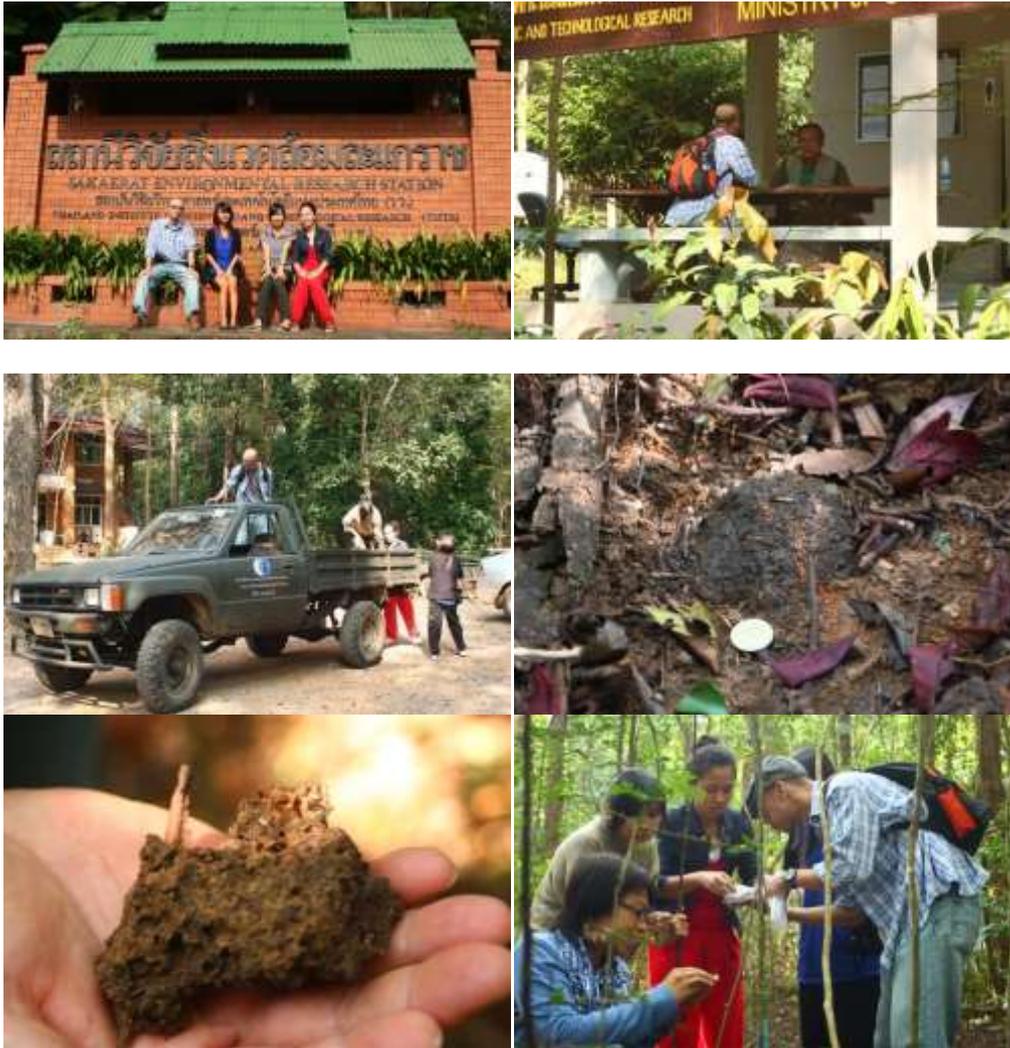
ผลและวิจารณ์

4.1 การเก็บตัวอย่าง

คณะผู้ทำการวิจัยได้เดินทางเพื่อเก็บตัวอย่างปลวกงานของปลวกสายพันธุ์ *Termes* sp. ซึ่งเป็นปลวกกินดิน (soil-feeding termite) ณ พื้นที่สวนชีวมณฑลสะแกกราช อำเภอ สีคิ้ว จังหวัด นครราชสีมา (ภาพที่ 3) โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้อำนวยการสถานีวิจัยในการจัดเจ้าหน้าที่ช่วยเหลือในการระบุสายพันธุ์ของปลวกที่ต้องการ ซึ่งมีลักษณะแสดงดังภาพที่ 4 นอกเหนือจากการเก็บตัวอย่างปลวกแล้วผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างจอมปลวกและดินบริเวณรอบๆจอมปลวก เพื่อตรวจวัดปัจจัยอื่นๆ เช่น ความชื้น และค่าความเป็นกรด-ด่าง

4.2 การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เนื่องจากแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตช้ากว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จึงจำเป็นต้องแยกเชื้อโดยการคัดแยกแบบเฉพาะเจาะจง (selective isolation) ร่วมกับการส่งเสริมการเจริญ (enrichment) บนอาหาร Humic acid vitamin agar ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งเจริญเติบโตได้เร็ว จากการทดลองพบว่าวิธีที่ใช้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี รวมทั้งเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการ อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อราบางสายพันธุ์ทนทานต่อสารปฏิชีวนะและสามารถเจริญบนอาหารที่ใช้คัดแยกเชื้อได้



ภาพที่ 3. การเก็บตัวอย่างปลวก ณ พื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราช อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา และรังปลวก *Termes* sp.



ภาพที่ 4 ลักษณะของปลวกทหาร (soldier termite) ของปลวกสายพันธุ์ *Termes* ซึ่งใช้ในการจัดจำแนกชนิดของปลวก

การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหารแยกเชื้อ (Humic acid vitamin agar) มีการเจริญเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่กระจายเป็นวง และสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นฝุ่นคล้ายผงแป้ง ดังแสดงในภาพที่ 5 จากการทดลองสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากลำไส้ปลวกได้จำนวนทั้งสิ้น 83 ไอโซเลท เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C



ภาพที่ 5. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Humic acid vitamin agar และเชื้อบริสุทธิ์

จากการตรวจวัดสมบัติทางกายภาพของดินพบว่าลำไส้ปลวกและจอมปลวกมีค่าความเป็นกรดในช่วงกลางถึงต่ำ โดยลำไส้ปลวกมีค่า 8 ซึ่งสูงกว่าดินบริเวณรอบรังปลวกซึ่งมีค่า 6.5 นอกจากนี้พบว่า

จอมปลวกมีความชื้นสูงกว่าดินบริเวณโดยรอบเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากภายในรังมีกระบวนการเมทาบอลิซึมของปลวก เช่นกระบวนการหายใจซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณความชื้นให้แก่จอมปลวก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพของตัวอย่าง พบว่าจำนวนเชื้อแอสคิตินิมัยสีที่แยกได้มีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่าง โดยเชื้อแอสคิตินิมัยสีที่มีการกระจายตัวในลำไส้ปลวก 7.3×10^4 โคโลนี/กรัม ตัวอย่าง ซึ่งต่ำกว่าจำนวนเชื้อที่ตรวจนับจากจอมปลวก (5.2×10^5 โคโลนี/กรัม ตัวอย่าง) และ ดินบริเวณจอมปลวกซึ่งมีการกระจายตัวของเชื้อแอสคิตินิมัยสีสูงถึง 9.6×10^7 โคโลนี/กรัม ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

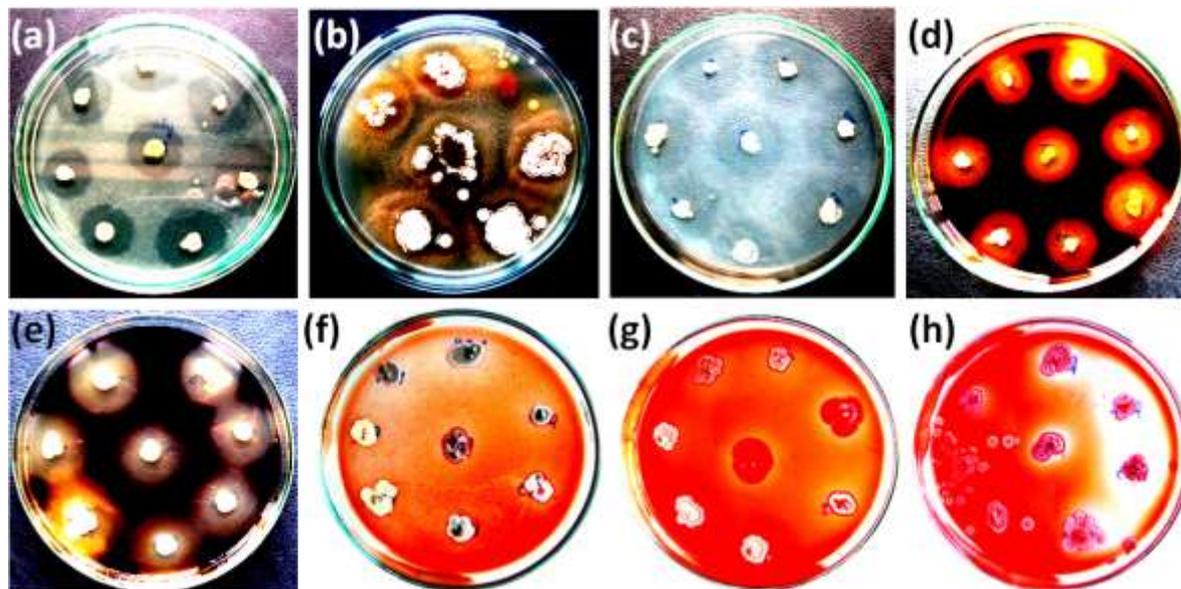
ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของลำไส้ปลวก จอมปลวก และดินบริเวณจอมปลวก

ตัวอย่าง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ความชื้น (%)	จำนวนเชื้อแอสคิตินิมัยสี (โคโลนี/กรัม ตัวอย่าง)
ลำไส้ปลวก	8	-	7.3×10^4
จอมปลวก	7.6	45	5.2×10^5
ดินบริเวณจอมปลวก	6.5	37	9.6×10^7

4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสและกรดยูริก

ความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสของเชื้อแอสคิตินิมัยสีที่แยกได้ ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิดซึ่งมีสารที่ต้องการทดสอบเป็นแหล่งคาร์บอนหลักได้แก่ ไกวอะคอล (guaiacol) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายลิกนิน เพื่อใช้ทดสอบการย่อยสลายลิกนิน, บีชวูด ไซแลน (beechwood xylan) เพื่อทดสอบการย่อยสลายไซแลน การย่อยสลายเซลลูโลสทดสอบด้วย คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose/CMC) ซึ่งเป็น amorphous เซลลูโลส และ กรดยูริก (uric acid) นอกจากนี้ยังทำการทดสอบการย่อยสลายสารประกอบชนิดอื่นๆ อีก 5 ชนิด คือ การย่อยแป้ง

(soluble starch), การย่อยแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch), การย่อยไขมัน (tween 80), การย่อยโปรตีน (sodium caseinate) และ อะไวเซล (Avicel) ซึ่งเป็นคริสตอลไลน์ เซลลูโลส ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การย่อยสลายสารทดสอบ uric acid (a), tween 80 (b), sodium caseinate (c), soluble starch (d), cassava starch (e), avicel cellulose (f), carboxymethylcellulose (g), beechwood xylan (h)

ผลการย่อยสลายสารทดสอบโดยเชื้อแอกติโนมัยสีทจากปลวก *Termes* sp. แสดงในตารางที่ 2 จากการทดลองพบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกจากปลวก *Termes* sp. สามารถย่อยสลายไซแลนได้ 37 ไอโซเลท ย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ 25 ไอโซเลท และย่อยสลายอะไวเซลเซลลูโลสได้ 21 ไอโซเลท นอกจากนี้พบว่าไม่มีสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกนินได้ และพบว่า 33 ไอโซเลทสามารถย่อยสลายกรดยูริกได้ เมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้ แป้งดิบและแป้งสุกเป็นตัวแทนของคาร์โบไฮเดรต และทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส สำหรับการย่อยสลายไขมัน และเอนไซม์ โปรติเอส สำหรับการย่อยสลายโปรตีน พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ถึง 65 ไอโซเลท รองลงมาคือย่อยสลายไขมันได้ 58 ไอโซเลท และย่อยสลายแป้ง (soluble starch) และแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ในจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือ 45 และ 43 ไอโซเลทตามลำดับ จำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ย่อยสลายสารทดสอบแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 3

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Termes* sp. ซึ่งเป็นปลวกกินดิน (soil-feeding termite) มีความสามารถสูงในการย่อยสลายประกอบในกลุ่ม คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันได้เป็นอย่างดี โดยมีเชื้อที่ย่อยสลายสารประกอบกลุ่มนี้คิดเป็น 55-84% ส่วนการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส และกรดยูริกคิดเป็น 27-48% เท่านั้น ทั้งนี้จึงสรุปได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายสารของแอคติโนมัยซีทในลำไส้ปลวกมีความสัมพันธ์กับแหล่งอาหารของปลวก โดยปลวก *Termes* sp. กินดินเป็นอาหารซึ่งอุดมไปด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด ทำให้สามารถแยกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบกลุ่ม คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ได้เป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 2 ผลการย่อยสารทดสอบโดยเชื้อแอสคิตินัยสีทจากปลวก *Termes* sp.

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R1	+++	+++	++	++	++	-	++	+	-
R2	+++	+	+++	++	++	-	++	+	-
R3	+++	+++	+++	+++	++	-	++	+	-
R4	+++	+++	++	-	-	-	++	++	-
R5	+++	+++	++	-	-	-	++	++	-
R6	+++	+++	+++	-	-	-	++	+	-
R7	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	-
R8	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+	-
R11	+	+++	+++	-	-	-	++	+	-
R19	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
R20	-	+++	-	-	-	+	-	++	-
R21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R22	+	-	+++	-	-	++	-	-	-
R26	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-
R30	-	++	+	+++	+++	-	+	+	-
R31	-	+++	++	++	++	-	+	+	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R32	-	+++	++	+++	+	-	-	-	-
R33	++	+	++	++	++	-	++	+	-
R34	-	+	+	++	++	-	+	-	-
R35	-	+++	++	-	-	-	+	+	-
R36	+	-	+++	-	++	-	+	-	-
R37	-	+	+++	-	++	-	+	+	-
R38	-	++	+	++	++	-	+	+	-
R39	-	+++	+	-	++	-	+	+	-
R40	+	++	+++	++	-	-	++	++	-
R41	+	++	+++	-	-	-	++	++	-
R42	++	+	++	-	-	-	-	+	-
R43	++	++	++	++	-	-	++	++	-
R44	++	+++	++	+++	++	-	+	+	-
R45	+	++	++	++	++	-	++	++	-
R46	+	++	+	+++	++	-	++	+	-
R47	+	+++	++	++	++	-	+	+	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R48	-	++	++	+++	++	-	-	+	-
R49	+	++	++	-	-	-	-	-	-
R50	-	+++	+	++	++	-	-	-	-
R51	-	++	++	+++	-	-	-	+	-
R52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R53	-	++	+++	+++	++	-	-	-	-
R54	+	+++	+	+++	++	-	+	-	-
R55	+	++	+	++	++	-	+	+	-
R56	-	-	++	++	-	-	-	-	-
R57	-	+	++	++	++	-	+	-	-
R58	-	+++	++	++	++	-	+	-	-
R60	-	-	++	-	-	-	-	-	-
R61	-	++	++	+++	++	-	+	+	-
R62	-	++	+++	++	-	-	-	-	-
R63	-	+	+++	-	++	-	+	+	-
R64	++	+++	+++	++	++	-	+	+	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R67	++	+++	-	-	-	-	-	-	-
R68	-	-	-	+	+	-	-	-	-
R69	+	++	-	-	+++	-	-	++	-
R70	+	++	-	-	++	-	-	-	-
R71	++	++	-	++	+++	-	+	++	-
R72	-	+++	-	++	++	-	-	-	-
R73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R74	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
R75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R77	-	-	-	+	-	-	-	-	-
R78	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R80	-	+	+++	-	-	-	-	-	-
R69	+	++	-	-	+++	-	-	++	-
R70	+	++	-	-	++	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R82	-	-	+++	-	+	-	-	+	-
R83	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R84	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
R85	-	++	-	-	-	-	-	+	-
R87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R89	-	++	+++	-	-	-	-	-	-
R90	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
R91	-	++	+++	-	-	-	+	-	-
R92	-	++	++	++	-	-	+	-	-
R93	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
R99	-	+	+	-	-	-	+	+	-
R101	+++	+	-	++	-	-	++	++	-
R102	++	-	++	+++	-	-	++	+	-
R103	-	+	+++	-	-	-	++	-	-
R104	-	++	++	-	-	-	++	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัส	การย่อยสลาย								
	Uric	Protein	Lipid	Xylan	CMC	Avicel	Starch	Cassava	Lignin
R105	-	++	+++	-	-	-	+	-	-
R106	++	-	-	-	-	-	++	++	-
R107	+	++	+++	-	-	-	++	+	-

หมายเหตุ -: ไม่ย่อยสลาย, +: วงไส้รอบโคโลนีขนาด 1-2 cm, ++: วงไส้รอบโคโลนีขนาด >2-3 cm, +++: วงไส้รอบโคโลนีขนาด >3 cm

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายสารทดสอบชนิดต่างๆ

สารทดสอบ	ชนิดของเอนไซม์	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีท	เปอร์เซ็นต์ (%)
Beechwood xylan	Xylanase	37	48.10
Carboxymethylcellulose	Cellulase	25	32.47
Avicel cellulose	Cellulase	21	27.27
Guaiacol	Ligninase	0	0
Uric acid	Uricase	33	42.86
Sodium caseinate	Protease	65	84.42
Tween 80	Lipase	58	75.32
Soluble starch	Amylase	45	58.44
Cassava starch	Amylase	43	55.84

จากการทดลองพบว่าเป็นไปตามการทดลองของ Gulve และ Deshmukh (2011) ซึ่งแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตะกอนในทะเล พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ส่วนใหญ่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสถึง 84.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองในครั้งนี้ ลำดับต่อมาคือการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (72.22%) และเอนไซม์เซลลูเลส (37.78%) ส่วนการผลิตเอนไซม์ยูริเอสคิดเป็น 16.67% อย่างไรก็ตามไม่สามารถเปรียบเทียบการย่อยสลายไขมันได้ เนื่องจาก Gulve และ Deshmukh ไม่ได้ทำการทดลองในส่วนนี้ จากการทดลองเห็นได้ชัดเจนว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจากลำไส้ปลวกมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายกรดยูริกได้มากกว่าแอคติโนมัยสีทจากแหล่งอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในลำไส้ปลวกเป็นสภาวะจำเพาะที่มีปริมาณของกรดยูริกสูงกว่าสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ในธรรมชาติ

นอกจากนี้ยังมีรายงานจากการทดลองของ Cao และคณะ (2009) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลสาบ salt lake จำนวน 63 ไอโซเลทมีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส 3 ไอโซเลทผลิตเอนไซม์โปรติเอส 46 ไอโซเลท ผลิตเอนไซม์อะไมเลส 14 ไอโซเลทผลิตเอนไซม์ esterase 34 ไอโซเลท ผลิต galactosidase 5 ไอโซเลท ผลิต cellulase และ 13 ไอโซเลท ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* และเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ

4.4 การทดสอบการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การทดลองการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (bioactive compound) เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบและเชื้อยีสต์ โดย *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเชื้อ *Candida utilis* เป็นตัวแทนของเชื้อยีสต์ ทดสอบด้วยวิธีขีดทับเชื้อทดสอบลงบนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญดีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP medium No. 2 ผลการยับยั้งสังเกตได้จากการเกิดบริเวณยับยั้งรอบโคโลนีดังแสดงในภาพที่ 7

จากการทดลองพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 77 ไอโซเลทหรือคิดเป็น 93 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 77 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีความสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้ 67 ไอโซเลท (คิดเป็น 87 เปอร์เซ็นต์) และ 66 ไอโซเลท (คิดเป็น 86 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Pseudomonas* ได้เพียง 9 (คิดเป็น 11.7%) และ 8 ไอโซเลท (คิดเป็น 10.4%) ตามลำดับเท่านั้น ส่วนการยับยั้งการเจริญของ เชื้อยีสต์ *Candida utilis* พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (คิดเป็น 3.9 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ R21 R41 และ R92 นอกจากนี้มีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 7 ไอโซเลทไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แก่ R2 R34 R49 R61 R83 R85 และ R91 พบว่าแอคติโนมัยซีท ส่วนใหญ่มีค่าการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ในขณะที่แอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ได้น้อย ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสรุปในตารางที่ 4



ภาพที่ 7 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเชื้อแอสคิตินอสีท; R89 (89), *Bacillus cereus* (B), *Staphylococcus aureus* (S), *Escherichia coli* (E), *Pseudomonas aeruginosa* (P) และ *Candida utilis* (C)

แอสคิตินอสีทกลุ่ม *Streptomyces* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย พบว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มแอสคิตินอสีท มาจากสกุล *Streptomyces* (Baltz, 1998) ส่วนแอสคิตินอสีทที่ไม่ใช่ *Streptomyces* เป็นกลุ่มที่น่าสนใจและเริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นแหล่งที่ดีสำหรับหาเชื้อสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ (Lazzarini *et al.*, 2000)

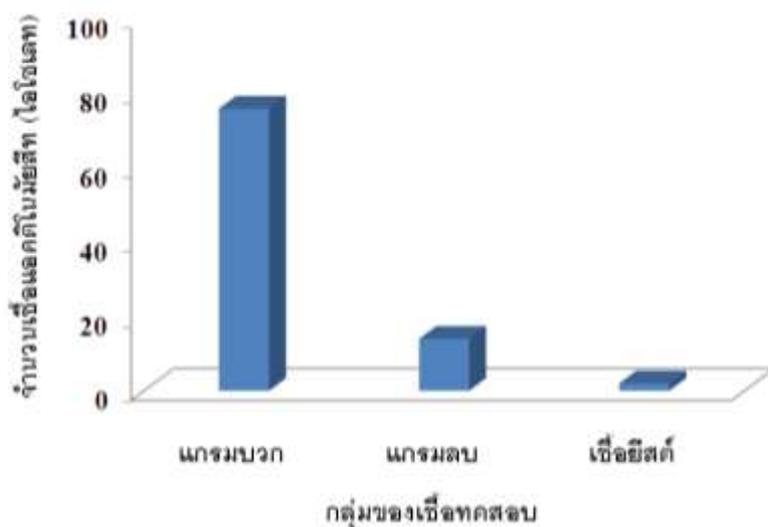
ตารางที่ 4 การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบโดยเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 77 ไอโซเลทบนอาหาร ISP medium No. 2

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	การยับยั้ง	
	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
<i>B. cereus</i>	66	86
<i>S. aureus</i>	67	87
<i>E. coli</i>	8	10
<i>P. aeruginosa</i>	8	10
<i>C. utilis</i>	3	3.9

จากผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเชื้อแอกติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลทดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยสีทเพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ โดยผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดกว้าง (broad spectrum) ได้แก่สายพันธุ์ R21 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus* และ *Streptococcus*) แกรมลบ (*E. coli*) และเชื้อยีสต์ (*Candida albilis*) ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* แอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ R55 สามารถยับยั้งการเจริญทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus* และ *Streptococcus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *Pseudomonas*) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์

พิจารณาจากความสามารถของแอกติโนมัยสีทในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ พบว่ามีแอกติโนมัยสีทจำนวน 76 ไอโซเลท (98.7%), 14 ไอโซเลท (18.2%) และ 3 ไอโซเลท (3.9%) (ภาพที่ 8) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ได้ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอกติโนมัยสีทที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

และยีสต์ ซึ่งขึ้นไปตามการรายงานของ Boudjella *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในประเทศแอลจีเรียสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *B. subtilis* และ *Micrococcus luteus* ได้ดีและไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้



ภาพที่ 8 จำนวนไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) และยีสต์ (*C. utilis*)

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม และกลไกการออกฤทธิ์ของสารเมทาบอลิทที่แอคติโนมัยสีทสร้าง พบว่าสารที่สร้างโดยแอคติโนมัยสีทจะมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยมีผลต่อการสร้างเปปติโดไกลแคน เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นของเปปติโดไกลแคน ยับยั้งขั้นตอน transpeptidation เป็นต้น โดยชั้นของเปปติโดไกลแคนดังกล่าวเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบบมีชั้นของเปปติโดไกลแคนที่บางกว่า รวมทั้งมีผนังชั้นนอก (outer membrane) เป็น lipopolysaccharide

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารเมทาบอลิทได้มากกว่าหนึ่งชนิด แต่ละชนิดมีกลไกการยับยั้งแตกต่างกัน นอกจากจะมีกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์แล้ว ยังมีกลไกการยับยั้งที่เยื่อหุ้มเซลล์

ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ยับยั้งการทำงานของไรโบโซม หรือมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ เป็นต้น

ความสามารถในการสร้างสารเมทาบอลิท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีท ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือ และฟอสเฟตอินทรีย์ สารตั้งต้น สารยับยั้ง เป็นต้น (Iwai and Omura, 1982) จากการทดลองนี้ได้ทำการทดลองการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเพียงชนิดเดียวคือ ISP medium No. 2 ซึ่งการที่บางไอโซเลทไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่อำนวยต่อการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นั้นๆ นอกจากนี้ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ รวมทั้งระยะเวลาในการบ่มเชื้อก็มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย ในการทดลองพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์มีการเจริญช้า ซึ่งระยะเวลา 7 วันนั้นอาจไม่เพียงพอให้เชื้อเจริญอย่างเต็มที่และไม่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณที่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชได้ดี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ช่วยให้พืชทนทานต่อการเกิดโรค รวมทั้งส่งเสริมการเจริญของพืช ลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช ตัวอย่างเช่น *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากรากของมะเขือเทศ สามารถส่งเสริมการเจริญและช่วยให้พืชต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคในมะเขือเทศได้ (Cao et al., 2006)

ตารางที่ 5 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเชื้อแอคติโนมัยสีท

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R1	+	+	-	-	-
R2	-	-	-	-	-
R3	+	-	-	-	-
R4	+	+	+	-	-
R5	-	+	-	-	-
R6	+	+	-	-	-
R7	+	-	-	-	-
R8	+	+	-	-	-
R11	-	+	-	-	-
R19	+	+	-	-	-
R20	+	-	-	-	-
R21	+	+	+	-	+
R22	+	+	-	+	-
R26	+	+	-	-	-
R30	+	+	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R31	+	+	-	-	-
R32	+	+	-	-	-
R33	+	+	+	-	-
R34	-	-	-	-	-
R35	+	+	-	-	-
R36	+	+	-	-	-
R37	-	+	-	-	-
R38	+	+	-	-	-
R39	+	+	-	-	-
R40	+	+	-	-	-
R41	+	+	-	-	+
R42	+	-	-	-	-
R43	+	+	-	-	-
R44	+	+	-	-	-
R45	+	+	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R47	+	+	-	-	-
R48	+	+	-	-	-
R49	-	-	-	-	-
R50	+	+	-	-	-
R51	+	+	-	-	-
R52	+	-	-	-	-
R53	+	+	-	-	-
R54	+	+	-	-	-
R55	-	+	-	-	-
R56	+	+	+	+	-
R57	+	+	-	-	-
R58	+	+	-	+	-
R60	-	+	+	-	-
R61	-	-	-	-	-
R62	+	+	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R64	+	+	+	-	-
R65	+	+	-	-	-
R66	-	+	-	-	-
R67	-	+	-	-	-
R68	-	+	-	+	-
R69	+	+	-	-	-
R70	+	+	-	-	-
R71	+	+	+	+	-
R72	-	+	-	-	-
R73	+	+	-	-	-
R74	+	+	-	-	-
R75	+	+	-	-	-
R76	+	+	-	-	-
R77	+	+	-	-	-
R78	+	+	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R80	+	-	-	-	-
R81	+	+	-	+	-
R82	+	+	-	-	-
R83	-	-	-	-	-
R84	-	+	-	-	-
R85	-	-	-	-	-
R87	+	+	-	+	-
R89	+	+	-	-	-
R90	+	-	-	-	-
R91	-	-	-	-	-
R92	+	+	-	-	+
R93	+	+	-	-	-
R99	+	-	-	-	-
R101	+	+	-	-	-
R102	+	+	+	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

การยับยั้ง					
รหัส	แบคทีเรียแกรมบวก		แบคทีเรียแกรมลบ		ยีสต์
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
R104	+	+	-	-	-
R105	+	+	+	-	-
R106	+	+	-	-	-
R107	+	+	-	-	-

หมายเหตุ -: ไม่ยับยั้ง, +: ยับยั้ง

4.5 การระบุสายพันธุ์เชื้อแอสโคไมซีต

4.5.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

เชื้อแอสโคไมซีตที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 83 ไอโซเลท ที่แยกจากปลวก *Termes sp.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบันทึกสีของสปอร์ สีของเส้นใยและรงควัตถุที่ละลายน้ำ ส่วนลักษณะของโครงสร้างอื่นๆ เช่น สายสปอร์และโครงสร้างพิเศษได้ทำการศึกษาบนอาหารแข็ง Humic acid vitamin agar ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) เมื่อทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยสีของสปอร์และเส้นใยร่วมกับลักษณะปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อแอสโคไมซีตได้เป็น 9 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะเด่นของสกุลต่างๆ โดยประกอบด้วยสกุล *Streptomyces* จำนวน 29 ไอโซเลท (35%) และแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายากจำนวน 54 ไอโซเลท (65%)

ในงานวิจัยนี้พบเชื้อแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* ในสัดส่วนที่ต่ำกว่าแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายาก เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้มีการเติมยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิดเช่น ฟีนอล ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกแบบจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายาก การคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ซึ่งเป็นสายพันธุ์หายากต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วยเช่น การอบดินด้วยความร้อนสูง การใช้สารเคมีเพื่อยับยั้งการเจริญของแอสโคไมซีตบางสกุล หรือการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ จะช่วยเพิ่มโอกาสที่จะพบเชื้อแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายากมากขึ้น (Hayakawa, 2008) โดยสารเคมีและความร้อนจะช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการรวมทั้งแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* ด้วย จากการทดลองพบว่าเชื้อแอสโคไมซีตที่แยกได้ส่วนใหญ่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล รงควัตถุที่พบส่วนใหญ่คือสีน้ำตาล

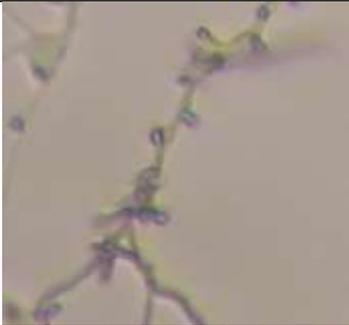
4.5.2 รายละเอียดของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุลต่างๆ ที่แยกจากปลวก *Termes sp.*

ก. แอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora*

แอคติโนมัยสีทในสกุลนี้จัดอยู่ในแฟมิลี *Streptosporangiaceae* เส้นใยมีการแตกแขนงสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นคู่บนสายของเส้นใยในอากาศซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 – 1.6 ไมโครเมตร สปอร์มีลักษณะเป็นรูปวงรีหรือรูปไข่ ไม่พบการสร้างสปอร์บนเส้นใยอาหาร สปอร์ที่แก่เต็มที่จะหลุดออกจากก้านชูสปอร์ได้ง่ายเมื่ออยู่ในน้ำ ฝัสดสปอร์ในกลุ่มนี้มีลักษณะฝัสดเรียบ แอคติโนมัยสีทในสกุลนี้มีทั้งชนิดที่เป็น mesophilic และ thermophilic ทุกสายพันธุ์ต้องการวิตามินบีสำหรับการเจริญ (Williams *et al.*, 1989)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส R30 ซึ่งเจริญบนอาหาร ISP medium No. 2 คือสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม สปอร์สีเทาเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ประกอบด้วย 2 สปอร์ ชูขึ้นมาจากเส้นใยอากาศ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

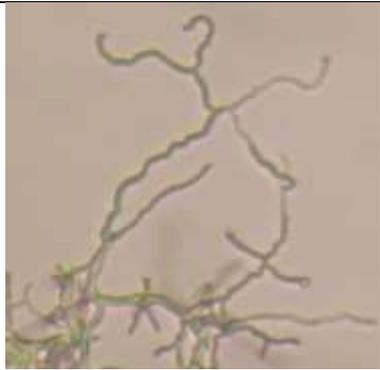
กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	เส้นใยราบ: Dark brown เส้นใยอากาศ: Dark grey รงควัตถุ: Light brown สายพันธุ์: 1 (R30)	

ข. แอคติโนมัยสีทสกุล *Nocardia*

แอคติโนมัยสีทสกุล *Nocardia* จัดอยู่ในแฟมิลี *Nocardiaceae* โดยสร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนงได้ดี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 ไมครอน เส้นใยเจริญบนผิวอาหารและมีการแทงลงไปบนเนื้ออาหาร มีการแตกหักได้โครงสร้างที่คล้ายแบคทีเรีย (bacteroid) มีรูปร่างเป็นแท่งไปจนถึงรูปร่างกลม ส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยอากาศและมีการสร้างโคนิเดีย (conidia) สายสั้นๆ หรือสายยาวบนเส้นใยอากาศ สร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่ (Williams *et al.*, 1989)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Nocardia* จำนวน 5 ไอโซเลทได้แก่ R69, R83, R77, R80, R84 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้เมื่อเจริญบนอาหาร ISP medium No. 2 พบว่าสร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมดำ ไม่มีเส้นใยอากาศรวมทั้งรงควัตถุ โคลินีมีขนาดเล็ก ผิวด้าน ไม่เป็นเงามีลักษณะคล้ายผงขอลึก เส้นใยอากาศสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า อาจสร้างมาก สร้างน้อย หรือไม่สร้างเลย อาจพบการสร้างหรือไม่สร้างรงควัตถุ รงควัตถุที่สร้างมีสีน้ำตาลหรือสีเหลือง (Williams *et al.*, 1989)

ตารางที่ 7 เชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Nocardia* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

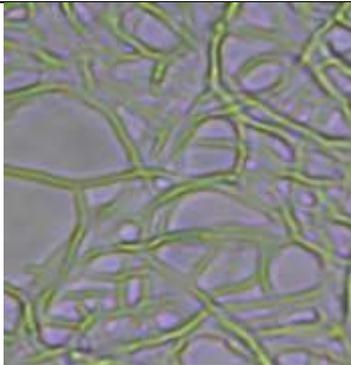
กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร ISP medium No.2	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
1	เส้นใยราบ: Orange-black เส้นใยอากาศ: ไม่มี รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์ : 5 (R69, R83, R77, R80, R84)	

ค. แอคติโนมัยสีทสกุล *Pseudonocardia*

แอกติโนมัยสีทในสกุลนี้จัดอยู่ในแฟมิลี *Pseudonocardiaceae* สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่หนาประมาณ 0.4-1 ไมโครเมตร สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ส่วนใหญ่มีรูปร่างซิกแซก (zigzag) สปอร์อาจมีผิวเรียบหรือเป็นหนาม มีขนาดสปอร์แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยปกติกว้าง 0.5-1 ไมโครเมตร ยาว 1.5-3.5 ไมโครเมตร ปลายสั้นใยวม เส้นใยเจริญยาวโดยการแตกหน่อ (budding) และมีการแตกหักเป็นท่อนๆ เส้นใยมีผนังเซลล์สองชั้น ไม่เคลือบที่ ต้องการอากาศในการเจริญ มีทั้งที่เป็น mesophilic และ thermophilic (Williams *et al.*, 1989)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่จัดอยู่ในสกุล *Pseudonocardia* เชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ R22, R89, R79, R70 พบว่าสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง และสปอร์สีขาวอมเทา บนอาหาร ISP medium No. 2 และไม่พบการสร้างรงควัตถุในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 8 เชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Pseudonocardia* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	เส้นใยราบ: Yellow เส้นใยอากาศ: White yellowish grey รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์ : 4 (R22 R89, R79, R70)	

ง. แอคติโนมัยสีทสกุล *Microtetraspora*

แอคติโนมัยสีทสกุล *Microtetraspora* สร้างเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร โดยเส้นใยจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเส้นใยราบที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาได้ดี มีการเจริญลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเส้นใยอากาศชูขึ้นมาจากเส้นใยราบซึ่งเจริญขึ้นมาบนอากาศโดยชูขึ้นมาจากผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ สปอร์เจริญอยู่บนเส้นใยอากาศเท่านั้นโดยไม่พบว่ามีสายสปอร์เจริญออกมาจากเส้นใยราบ สปอร์จะเจริญอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า sporophore

จากการทดลองพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 16 ไอโซเลท จัดจำแนกเป็นเชื้อในสกุล *Microtetraspora* จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างละเอียดสามารถจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้ได้เป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ R21, R53, R61 ทั้ง 3 ไอโซเลท สร้างเส้นใยราบสีแดงอมชมพู และเส้นใยอากาศสีขาวและขาวอมเหลือง ไม่พบการสร้างรงควัตถุ สายสปอร์ยื่นออกมาจาก sporophore บนเส้นใยอากาศ สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ ลักษณะของสายสปอร์จะรวมกันเป็นกลุ่ม ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 8 สปอร์

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดของสกุล *Microtetraspora* ที่แยกได้จากการทดลองนี้ ได้แก่ R1, R2, R3, R4, R5, R6, R8, R64, R74 จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีเส้นใยราบสีน้ำตาลและเส้นใยอากาศสีเหลืองอมน้ำตาลและสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์อยู่บน sporophore ที่ยื่นออกมาจากเส้นใยอากาศ มีการแตกกิ่งก้านออกมาจากเส้นใยอากาศได้ดี สายสปอร์มีลักษณะยาวและบิดงอเล็กน้อย ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 4-12 สปอร์

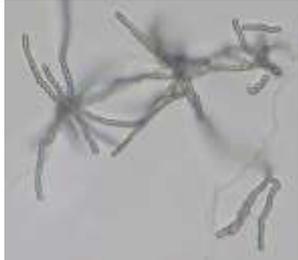
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอคติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ R40, R55 ทั้งสองไอโซเลทมีเส้นใยราบสีส้มอมน้ำตาลและเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา และไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยื่นออกมาจาก sporophore ที่อยู่บนเส้นใยอากาศ สายสปอร์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่น ประกอบด้วยสายสปอร์หลายลักษณะทั้งตรง บิดงอ และหยัก สายสปอร์มีจำนวน 4-20 สปอร์

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ R7 แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้สร้างเส้นใยอาหารที่มีสีน้ำตาล เส้นใยอากาศสีเหลืองและผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์มีลักษณะตรงและอยู่เป็นกลุ่ม ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 6-12 สปอร์

ตารางที่ 9 เชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Microtetraspora* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	<p>เส้นใยราบ: Red/pink</p> <p>เส้นใยอากาศ: White/white yellow</p> <p>รงควัตถุ: ไม่ผลิต</p> <p>สายพันธุ์: 3</p> <p>(R21, R53, R61)</p>	
2	<p>เส้นใยราบ: Brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: Yellow brown</p> <p>รงควัตถุ: Light brown</p> <p>สายพันธุ์: 9</p> <p>(R1, R2, R3, R4, R5, R6, R8, R64, R74)</p>	
3	<p>เส้นใยราบ: Orange brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: White brown</p> <p>รงควัตถุ: -</p> <p>สายพันธุ์: 2</p> <p>(R40, R55)</p>	

ตารางที่ 9 (ต่อ)

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
4	เส้นใยราบ: Brown เส้นใยอากาศ: Yellow รงควัตถุ: Light brown สายพันธุ์: 1 (R7)	

จ. แอคติโนมัยซีทสกุล *Actinomadura*

สกุล *Actinomadura* จัดอยู่ในแฟมิลี *Thermomonosporaceae* ซึ่งรวมไปถึงสกุล *Actinocorallia*, *Spirillospora* และ *Thermomonospora* (Zhang et al., 1998) เชื้อในสกุล *actinomadura* เป็นจุลินทรีย์แกรมบวกที่ต้องการอากาศ ไม่ติดสี acidfast และไม่เคลื่อนที่ โครงสร้างทั่วไปไม่มีการแตกหัก เส้นใยราบมีการแตกกิ่งก้านได้ดี ส่วนเส้นใยอากาศมีลักษณะที่หลากหลายทั้งสั้นและยาว เป็นสายตรง โค้งงอคล้ายตะขอ สายบิดเป็นเกลียว ส่วนผิวของสปอร์ก็มีความหลากหลายทั้งผิวเรียบ ขรุขระ สปอร์มีขนาด $0.5-0.7 \times 0.8-1.2$ ไมโครเมตร (Goodfellow, 1989)

จากการทดลองพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 17 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับสกุล *Actinomadura* โดยแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีเส้นใยราบมีสีน้ำตาลอมส้ม เส้นใยอากาศสีขาว ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์สายสั้นยื่นออกมาจากเส้นใยอากาศมีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ (hook) ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 5-7 สปอร์ เชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 1 ไอโซเลทคือ R52

กลุ่มที่ 2 มีลักษณะของสายสปอร์คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 1 แต่แตกต่างกันที่สีของเส้นใยบนอาหาร โดยในกลุ่มนี้มีเส้นใยราบที่มีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ส่วนเส้นใยอากาศมีสีเทา และไม่สร้างรงควัตถุบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์มีขนาดสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 7สปอร์ ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 4 ไอโซเลทคือ R20, R26, R54, R57

กลุ่มที่ 3 มีเส้นใยราบสีน้ำตาล เส้นใยอากาศสีขาวอมน้ำตาล ไม่ผลิตรงควัตถุนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยาว ประกอบด้วยสปอร์ 15 สปอร์ ประกอบด้วยแอกติโนมัยสีทจำนวน 4 ไอโซเลทได้แก่ R32, R34, R36, R44

กลุ่มที่ 4 เส้นใยราบมีสีเหลือง และเส้นใยอากาศสีขาวอมน้ำตาล ไม่พบการสร้างรงควัตถุนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์มีขนาดเล็กอยู่เป็นกลุ่ม ไม่สามารถนับจำนวนสปอร์ได้อย่างชัดเจน ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลทได้แก่ R38, R49, R50, R51

กลุ่มที่ 5 เส้นใยราบสีน้ำตาลเข้มและเส้นใยอากาศสีน้ำตาลอมเทา พบการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะของสายสปอร์คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 3 โดยสายสปอร์มีลักษณะยาว ม้วนงอที่ปลายเล็กน้อย มีจำนวนสปอร์ประมาณ 15 สปอร์ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลทคือ R41

กลุ่มที่ 6 สร้างเส้นใยราบที่มีสีน้ำตาลอ่อนและเส้นใยอาหารสีขาวอมน้ำตาล ไม่พบการสร้างรงควัตถุนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสายสปอร์คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 5 โดยมีสายสปอร์ยาว และมีรูปแบบตั้งแต่สายตรง งอที่ปลาย และบิดเป็นเกลียว แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มี 1 ไอโซเลทได้แก่ R47

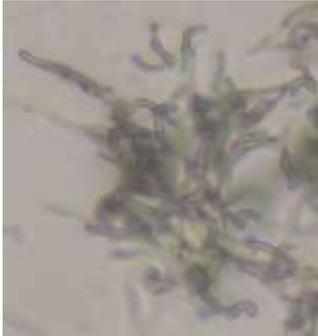
กลุ่มที่ 7 เส้นใยราบสีน้ำตาลเข้ม เส้นใยอากาศสีเหลืองอมน้ำตาล และสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยื่นมาจากเส้นใยอากาศที่มีการแตกกิ่งก้านได้ดี สายสปอร์มีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ มีสปอร์จำนวน 8 สปอร์ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อแอกติโนมัยสีท 1 ไอโซเลทคือ R19

กลุ่มที่ 8 มีเส้นใยราบสีน้ำตาล และเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาล เส้นใยแตกกิ่งก้านได้ดี สายสปอร์ยื่นออกมาจากเส้นใยอากาศ ลักษณะของสายสปอร์มีการงอที่ปลายเล็กน้อย ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 7 สปอร์ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 สายพันธุ์คือ R61

ตารางที่ 10 เชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Actinomadura* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ISP medium No.2		
1	<p>เส้นใยราบ: Orange brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: White</p> <p>รงควัตถุ: ไม่ผลิต</p> <p>สายพันธุ์: 1</p> <p>(R52)</p>	
2	<p>เส้นใยราบ: Brown-black</p> <p>เส้นใยอากาศ: grey</p> <p>รงควัตถุ: ไม่ผลิต</p> <p>สายพันธุ์: 4</p> <p>(R20, R26, R54, R57)</p>	
3	<p>เส้นใยราบ: Brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: White brown</p> <p>รงควัตถุ: ไม่ผลิต</p> <p>สายพันธุ์: 4</p> <p>(R32, R34, R36, R44)</p>	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ISP medium No.2		
4	เส้นใยราบ: Yellow เส้นใยอากาศ: White brown รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์: 4 (R38, R49, R50, R51)	
5	เส้นใยราบ: Dark brown เส้นใยอากาศ: Brown grey รงควัตถุ: Light brown สายพันธุ์: 1 (R41)	
6	เส้นใยราบ: Light brown เส้นใยอากาศ: White brown รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์: 1 (R47)	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ISP medium No.2		
7	เส้นใยราบ: Dark brown	
	เส้นใยอากาศ: Yellowish brown	
	รงควัตถุ: Light brown	
	สายพันธุ์: 1	
	(R19)	
8	เส้นใยราบ: Brown	
	เส้นใยอากาศ: Grayish brown	
	รงควัตถุ: ไม่ผลิต	
	สายพันธุ์: 1	
	(R61)	

จ. แอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*

Streptomyces เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici, 1943) *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีจำนวนมากที่สุดและมีความสำคัญที่สุดในกลุ่มของแอคติโนมัยสีท เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากมาย (Goodfellow, 1985) เส้นใยของ *Streptomyces* แตกกิ่งก้านได้ดี โดยเส้นใยไม่มีผนังกัน การเจริญในระยะแรกจะสร้างเส้นใยราบในอาหารก่อนต่อมาจะพัฒนาเป็นเส้นใยอากาศ โคลินีมีผิวเรียบ สร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใยอากาศจนปรากฏเป็นกลุ่มคล้ายผงแป้งบนอาหารแข็ง สปอร์มีสีฟ้า เทา เขียว แดง ม่วง ขาว และเหลือง เส้นใยอาหารมีสีฟ้า เขียวเข้ม แดง และม่วง ทำให้เห็นสีของเส้นใยแตกต่างกัน การจัดเรียงสายสปอร์มี 3 แบบคือ แบบตรงหรือโค้งงอ (rectiflexible) เป็นตะขอ ลูป หรือเกลียว 1-2 รอบ (retinaculiaperti) และแบบเกลียว (spirales)

จากการทดลองพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่แยกได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยพิจารณาจากลักษณะของสายสปอร์เป็นสำคัญ โดยลักษณะเด่นของเชื้อในสกุลนี้คือ มีสายสปอร์ที่มีการบิดเป็นเกลียวหลายรูปแบบ ประกอบด้วยแอคติโนมัยสีทจำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งได้แบ่งออกเป็น 10 กลุ่มย่อยตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ R63, R81, R85, R105 แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีเส้นใยราบสีน้ำตาลเข้มอมดำ เส้นใยอากาศมีสีน้ำตาลเข้มและพบว่าสร้างรงควัตถุสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์เจริญจากเส้นใยอากาศที่แตกกิ่งก้านได้ดี สายสปอร์มีขนาดสั้นบิดงอจนถึงขดเป็นเกลียวจำนวน 1 รอบที่ส่วนปลายสายสปอร์ ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 14 สปอร์

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอคติโนมัยสีทจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ R33, R43, R45, R46, R72, R76 โดยทั้ง 6 ไอโซเลทมีเส้นใยราบสีน้ำตาลเข้ม เส้นใยอากาศสีเทาเข้มและสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์มีขนาดยาวและอยู่เป็นกลุ่ม ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 20-50 สปอร์ มีลักษณะบิดเป็นเกลียวมากถึง 3 รอบ

กลุ่มที่ 3 ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยแอคติโนมัยสีทจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ R35, R39, R78, R91 แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีเส้นใยราบสีน้ำตาล และเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาล แต่ไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของสายสปอร์ยาวและคล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 2 โดยสปอร์มีสายยาวและอยู่เป็นกลุ่ม ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 20-50 สปอร์ มีลักษณะบิดเป็นเกลียวมากถึง 3 รอบ

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อแอสโคไมซีต 2 ไอโซเลท ได้แก่ R66, R92 โดยสร้างเส้นใยราบที่มีสีเทาไปจนถึงดำ เส้นใยอากาศสีเทาปนดำเช่นกันและพบการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยื่นออกมาจากเส้นใยอากาศที่มีการแตกกิ่งก้านได้ดี มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว 4-5 รอบและอัดตัวแน่นโดยแต่ละรอบของเกลียวอยู่ชิดกัน ซึ่งต่างไปจาก *Streptomyces* ในกลุ่มอื่นๆที่รอบของเกลียวจะอยู่ห่างจากกัน

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่มีสีของเส้นใยราบและเส้นใยอากาศต่างไปจากกลุ่มอื่น คือมีเส้นใยราบและเส้นใยอากาศมีสีเหลืองอมน้ำตาล และพบว่ามีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองสดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แอสโคไมซีตในกลุ่มนี้มีเพียง 1 ไอโซเลทคือ R107 ทั้งนี้ยังพบว่า *Streptomyces* ในกลุ่มนี้มีลักษณะของสายสปอร์คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 2 และ 3 แต่มีระยะห่างระหว่างเกลียวสั้นกว่า และมีลักษณะบิดเป็นเกลียวที่ส่วนปลาย ส่วนกลุ่มที่ 2 และ 3 โดยมีการบิดเป็นเกลียวตั้งแต่ส่วนต้นของสายสปอร์ โดยสปอร์มีสายยาวและอยู่เป็นกลุ่ม ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 20-50 สปอร์ มีลักษณะบิดเป็นเกลียวมากถึง 3 รอบ

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มที่มีสีเหลืองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 5 แต่ไม่พบการสร้างรงควัตถุ *Streptomyces* ในกลุ่มนี้มีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ R60, R48, R68 ซึ่งมีเส้นใยราบสีเหลือง เส้นใยอากาศสีเหลืองอมน้ำตาล และไม่พบการผลิตรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยาวและบิดเป็นเกลียวตั้งแต่ส่วนต้นของสายสปอร์ แต่ละเกลียวอยู่ห่างกัน ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 20-50 สปอร์ มีลักษณะบิดเป็นเกลียวมากถึง 4 รอบ

กลุ่มที่ 7 มีเส้นใยราบสีน้ำตาลเข้ม ส่วนเส้นใยอากาศมีสีแดงอมน้ำตาล และพบการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อแอสโคไมซีตจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ R67, R103 สายสปอร์สั้นสร้างอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะโค้งงอที่ส่วนปลาย

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยแอสโคไมซีตจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ R58, R62, R42, R104 ทั้ง 4 ไอโซเลทมีเส้นใยราบสีเหลืองอ่อนอมน้ำตาล ส่วนเส้นใยอากาศมีสีขาวอมเทาและไม่ผลิตรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์ยื่นออกมาจากเส้นใยอากาศ มีการแตกกิ่งก้านได้ดี สายสปอร์มีขนาดยาวและมีการบิดเป็นเกลียวห่างๆ จำนวน 3-4 รอบ

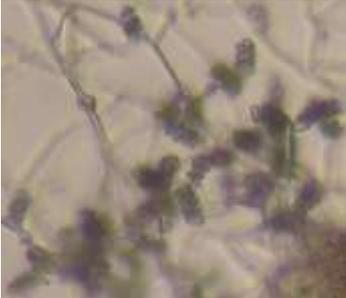
กลุ่มที่ 9 เส้นใยราบมีสีน้ำตาล เส้นใยอากาศสีขาวอมน้ำตาลและไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยแอสคิโนมายซีทจำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ R56, R65, R75 สายสปอร์มีการแตกกิ่งก้านได้ดี มีขนาดยาวและมีการบิดเป็นเกลียวห่างๆ จำนวน 3-4 รอบ

กลุ่มที่ 10 ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยแอสคิโนมายซีทเพียง 1 ไอโซเลทคือ R102 โดยแอสคิโนมายซีทไอโซเลทนี้มีเส้นใยราบสีน้ำตาลเข้ม ส่วนเส้นใยอากาศมีสีน้ำตาลและพบว่าการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายสปอร์แตกต่างไปจากกลุ่มอื่นๆ โดยพบว่ามีสายสปอร์ที่สั้นประมาณ 10 สปอร์ยื่นออกมาจากเส้นใยราบ

ตารางที่ 11 เชื้อแอสโตสปอร์มาซีสสกูล *Streptomyces* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	<p>เส้นใยราบ: Brown-black</p> <p>เส้นใยอากาศ: Dark brown</p> <p>รงควัตถุ: Black</p> <p>สายพันธุ์ : 4</p> <p>(R63, R81, R85, R105)</p>	
2	<p>เส้นใยราบ: Dark brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: Dark grey</p> <p>รงควัตถุ: Light brown</p> <p>สายพันธุ์ : 6</p> <p>(R33, R43, R45, R46, R72, R76)</p>	
3	<p>เส้นใยราบ: Brown</p> <p>เส้นใยอากาศ: Grayish brown</p> <p>รงควัตถุ: -</p> <p>สายพันธุ์ : 4</p> <p>(R35, R39, R78, R91)</p>	

ตารางที่ 11 (ต่อ)

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ISP medium No.2		
4	เส้นใยราบ: Grayish black เส้นใยอากาศ: Grayish black รงควัตถุ: brown สายพันธุ์ : 2 (R66, R92)	
5	เส้นใยราบ: Yellow brown เส้นใยอากาศ: Yellow brown รงควัตถุ: Vivid yellow สายพันธุ์ : 1 (R107)	
6	เส้นใยราบ: Yellow เส้นใยอากาศ: Yellow brown รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์ : 3 (R60, R48, R68)	

ตารางที่ 11 (ต่อ)

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ISP medium No.2		
7	เส้นใยราบ: Dark brown	
	เส้นใยอากาศ: Light red brown	
	รงควัตถุ: Dark brown	
	สายพันธุ์: 2 (R67, R103)	
8	เส้นใยราบ: Light yellow brown	
	เส้นใยอากาศ: White grey	
	รงควัตถุ: -	
	สายพันธุ์: 4(R58, R62, R42, R104)	
9	เส้นใยราบ: Brown	
	เส้นใยอากาศ: White brown	
	รงควัตถุ: ไม่ผลิต	
	R56, R65, R75 (9)	
10	เส้นใยราบ: Dark brown	
	เส้นใยอากาศ: Brown	
	รงควัตถุ: Dark brown	
	สายพันธุ์: 1 (R102)	

ช. แอคติโนมัยสีทสกุล *Streptosporangium*

สกุล *Streptosporangium* ถูกจัดจำแนกเชื้อในสกุลนี้จากโครงสร้างของ sporangiospore ซึ่งไม่เคลื่อนที่ มีการจัดเรียงตัวโดยบิดเป็นเกลียวแล้วขดอยู่ภายใน sporangium เส้นใยราบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร และส่วนของ sporangium ชูขึ้นมาจากส่วนของเส้นใยอากาศ sporangium มักมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-12 ไมโครเมตร sporangiophore ที่ยังไม่แก่เต็มที่ จะมีลักษณะเป็นขดอยู่ภายใน sporangia ส่วน sporangiophore ที่แก่เต็มที่จะมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือรูปไข่ ผนังของ sporangium นั้นแตกหักได้ง่าย ซึ่งช่วยในการปลดปล่อย spore จำนวนมากออกสู่สิ่งแวดล้อม

จากการทดลองพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลทที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Streptosporangium* ได้แก่ R37, R99 ซึ่งทั้งสองไอโซเลทนี้มีลักษณะเหมือนกัน โดยมีสีของเส้นใยราบสีเหลืองอ่อน เส้นใยอากาศสีเทาปนขาวและไม่พบการสร้างรงควัตถุนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อศึกษาโครงสร้างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามี Sporangium เป็นโครงสร้างพิเศษ sporangium ชูขึ้นมาจากเส้นใยอากาศ sporangium มีลักษณะรีหรือกลม เมื่อแตกออกจะปลดปล่อยสปอร์ออกมาดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 12 เชื้อแอสโคไมซีตสกุล *Streptosporangium* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

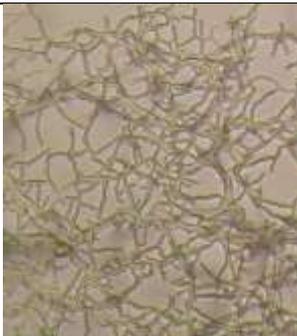
กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	<p>เส้นใยราบ: Light yellow</p> <p>เส้นใยอากาศ: Greyish white</p> <p>รงควัตถุ: ไม่ผลิต</p> <p>สายพันธุ์: 2</p> <p>(R37, R99)</p>	

ซ. แอสโคไมซีตสกุล *Saccharopolyspora*

แอสโคไมซีตสกุล *Saccharopolyspora* ถูกตั้งขึ้นโดย Lacey & Goodfellow (1975) โดย *Saccharopolyspora* สายพันธุ์แรกแยกได้จากกองปุ๋ยหมักขานอ้อย ลักษณะสำคัญของเชื้อแอสโคไมซีตในสกุลนี้คือ ต้องการอากาศ ไม่ติดสี acid-fast มีการสร้างเส้นใยราบที่แตกกิ่งก้านได้ดีและสามารถแตกหักเป็นชิ้นที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ส่วนเส้นใยอากาศจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสายของสปอร์ที่มีรูปร่างกลมคล้ายลูกบิด

จากการทดลองสามารถจัดจำแนกเชื้อในสกุลนี้ได้เพียง 1 กลุ่มโดยมีสมาชิกจำนวน 7 ไอโซเลทด้วยกัน ได้แก่ R71, R87, R90, R93, R11, R101, R106 ซึ่งทั้งหมดมีลักษณะโครงสร้างและสัณฐานวิทยาเหมือนกันคือ มีการสร้างเส้นใยราบสีครีม ไม่พบเส้นใยอากาศรวมทั้งไม่ผลิตรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่ามีการสร้างเส้นใยอากาศที่ประกอบด้วยสายยาวของสปอร์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Humic acid vitamin agar ส่วนของเส้นใยราบนั้นมีการแตกกิ่งก้านและหักเป็นท่อน

ตารางที่ 13 เชื้อแอสโคไมซีตสกุล *Saccharopolyspora* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	เส้นใยราบ: Cream เส้นใยอากาศ: - รงควัตถุ: ไม่ผลิต สายพันธุ์: 7 (R71, R87, R90, R93, R11, R101, R106)	

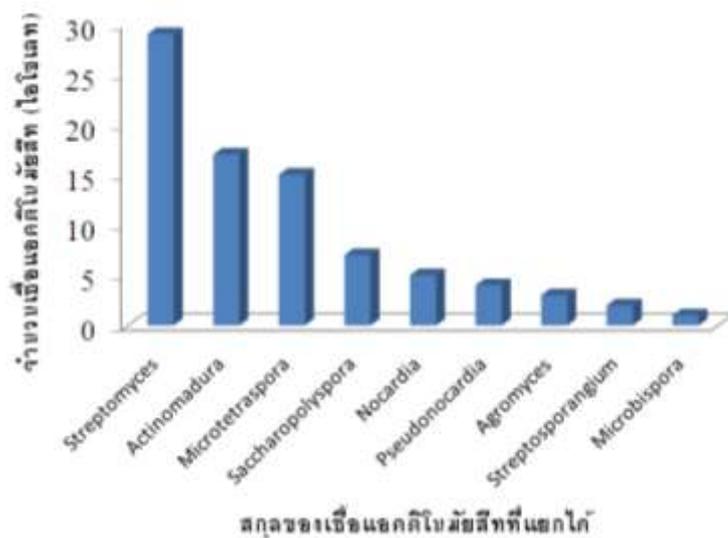
ณ. แอสโคไมซีตสกุล *Agromyces*

แอสโคไมซีตสกุล *Agromyces* ได้ตั้งขึ้นโดย Gledhill และ Casida (1969) โดยสายพันธุ์แรกที่ค้นพบคือ *Agromyces ramosus* ซึ่งคัดแยกจากดิน มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกกิ่งก้านได้ดี เส้นใยแตกหักได้เป็นชิ้นส่วนที่มีลักษณะเป็น diphtheroid และ rod like ที่ไม่ปกติ เซลล์มีขนาด 0.5-0.9 × 1.0-1.4 ไมโครเมตร โคโลนีมีทรงกลม ผิวเรียบและมีสีเหลือง จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด พบว่ามีเชื้อแอสโคไมซีตจำนวน 2 ไอโซเลทได้แก่ R73, R82 ที่มีลักษณะของสกุล *Agromyces* แอสโคไมซีตทั้ง 2 ไอโซเลทมีเส้นใยราบสีเหลือง และ เส้นใยอากาศสีขาวอมน้ำตาล ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศมีการแตกกิ่งก้านได้ดี และหักเป็นท่อนที่มีลักษณะเป็นแท่ง

ตารางที่ 14 เชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Agromyces* และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กลุ่มที่	การเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
	ISP medium No.2	
1	เส้นใยราบ: Yellow เส้นใยอากาศ: White brown รงควัตถุ: ไม่มี สายพันธุ์ : 2 (R73, R82)	

จากการทดลองสามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจากการจัดจำแนกโดยสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งเชื้อแอกติโนมัยสีทได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ แอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* และกลุ่ม non-*Streptomyces* หรือกลุ่มแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์หายาก จำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีทในแต่ละสกุลได้แสดงไว้ในภาพที่ 9 พบว่าแอกติโนมัยสีทที่พบมากที่สุดคือสกุล *Streptomyces* สามารถแยกได้ 29 ไอโซเลท คิดเป็น 35% ส่วนเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์หายากแยกได้จำนวน 54 ไอโซเลท คิดเป็น 65% ในจำนวนนี้ประกอบด้วยแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์หายากจำนวน 8 สกุล ได้แก่ *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Agromyces*, *Streptosporangium* และ *Microbispora* โดยสกุลที่แยกได้มากเป็นอันดับแรกคือ *Actinomadura* แยกได้ 17 ไอโซเลท (20.5%) ลำดับรองลงมาคือสกุล *Microtetraspora* 15 ไอโซเลท (18.1%) *Saccharopolyspora* 7 ไอโซเลท (8.4%) *Nocardia* 5 ไอโซเลท (6%) *Pseudonocardia* 4 ไอโซเลท (4.8%) *Agromyces* 2 ไอโซเลท (3.6%) *Streptosporangium* 2 ไอโซเลท (2.4%) และ *Microbispora* 2 ไอโซเลท (1.2%) (ตารางที่ 15)



ภาพที่ 9 จำนวนของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกจากปลวก *Termes* sp.

ตารางที่ 15 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จัดจำแนกตามสกุลและสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์

สกุล	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ (%)
<i>Streptomyces</i>	29	35.0
<i>Actinomadura</i>	17	20.5
<i>Microtetraspora</i>	15	18.1
<i>Saccharopolyspora</i>	7	8.4
<i>Nocardia</i>	5	6.0
<i>Pseudonocardia</i>	4	4.8
<i>Agromyces</i>	2	3.6
<i>Streptosporangium</i>	2	2.4
<i>Microbispora</i>	1	1.2

4.5.3 การระบุสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 1500 เบส ของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาจำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ R58 และ R11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ยูริเคสย่อยสลายกรดยูริคได้ดี และ R102 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างกว้าง (broad spectrum) โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีจำนวน 2 ไอโซเลทที่มีความคล้ายคลึงกับ 16S rDNA ที่พบในสกุล *Streptomyces* ส่วนอีก 1 ไอโซเลทนั้นมีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ *Saccharopolyspora* โดยมีลำดับความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 98-100% (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอคติโนมัยสีทจากปลวก *Termes* sp. เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

รหัส	สายพันธุ์คล้ายคลึง	ความคล้ายคลึง (%)
R11	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> (AF002818)	98.9
R58	<i>Streptomyces malaysiensis</i> (AB249918)	99.7
R102	<i>Streptomyces nivioruber</i> (DQ445796)	100.0

> R11_16S ribosomal RNA gene

GTCCAGCCAGTCGAACGCTGAAGCATCTTCGAGGTGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG
 TAATCTGCCCTGCACCTCTGGGATAAGCCTTGGAAACGGGGTCTAATTCGGGATATGACACATTATCGCAT
 GGTGGTGTGTGAAAGTTCTGGCGGTGCAGGATGAGTCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGGATGG
 CCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATCTTGCAGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACCGCCGCTG
 GGGATGACGGCTTCGGGTGTAAACCCCTTTCGACATCGACGAAGCCTTCGGGTGACGGTAGGTGTAGA
 AGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGGCGTTCTCCGGATTATT
 GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTCGCTCGGCCGTGAAAACCTGCAGCTTAAGTGTGGGCTTGGC
 GTCGATACGGGCAGACTTGAATTCGGGAGGGGAGACTGGAATTCCTGGGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
 ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
 GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGTTGGGCCCTAGGTGTGGGGATGGGTTT
 CACTGTTTCCGTGCGGTAGCTAACGCATTAAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTC
 AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTT
 ACCTGGGTTTGACATGCCTAGACAGTCCAGAGATGGGGTTCCCTTGTGGTGTGTACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTCTGACTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGCCTATG
 TTGCCAGCGGGTTATGCCGGGACTCCTGGGGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAGTCATCATGCCCTTATGCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCTGTCACAGAGGGTGGCGATA
 TCGTGAGGTGGGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGACTCGGACTGCAACTCGACCTCGTGAA
 GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGC
 CCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCATGGCCCAACCTTGTGGGGGAGTGGTCAAGG
 TGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>R58_16S ribosomal RNA gene

AACGAACGCTGGCGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTCCGGCCGGGGATTAGTGG
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTTCGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATA
 CCGGATANGACCGCTTCCCGCATGGGATACGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCCT
 ATCAGCTTGTAGTGTGGGATGATGGCCTACCAAGCGCAGCAAGCGGTAGCCGGCTAGAGAGGGCGCACG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
 GCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA
 GAAGCGTGAGTGCAGCTACTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTA
 GGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATGGCGTAAGAGCTCCTGAGCGCGCTTGTGCGCTGGATGTGAAA
 GCCCGGGCTTACCTCCGGTCTGCATTGCATACGGGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGT
 TGGGACTAGGTGTGGGCGACATCCACGTTGTCCGTGCCAGCTAACGCATTAAAGTTCCTCCCGCTGGG
 GAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGCCGAGCATGTGGCTT
 AATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCC
 CTTGTGGTCCGTGTACAGGTGTGCATGGCTGTCTGCTCAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCTTGTCCCTGTGTGCCAGCGGGTTATGCCGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGT
 AACTCGGAGGAAGGTGGGAGCAGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA
 ATGGCCCGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
 GGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATA
 CGTTCCTCCGGCTTGTACACACCCCGCTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAA
 CCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG

>R102_16S ribosomal RNA gene

ATCCTGGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTCTGAGTTTGTATTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGC
 TTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
 GCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGAGCCTGGGAGGCA
 TCTCCCGGGTTGTAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATG
 GCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCC
 AGACTCCTACGGGAGGCGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGATGCAGCGACCGCGCTG
 AGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAA
 GAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATATTG
 GCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTACGCTCGGGTGTGAAAGCCGGGCTTAAACCCGGGCTTGCAT
 TCGATAACGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATA
 TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
 AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCA
 CGTTCTGCTGGTGGCGAGCTAACGCATTAAAGTTCCTCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTA
 CCAAGGCTTGACATACACCGGAAGCATTAGAGATAGTCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGTGCA
 TGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGT
 TGCCAGATGCCCTTCGGGGTGTGGGACTCACAGGAGACCGCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
 ACCAGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCT
 GCGAAACCGTGGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
 CATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACA
 CACCGCCCGTACGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ R11 R58 และ R102

ยูริเคสหรือยูเรทออกไซด์ (EC 1.7.3.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเพื่อเปิดโครงสร้างที่เป็นวงของพิวรีนของยูเรทเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะลันโตอิน (alantoin), คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ยูริเคสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ทางการแพทย์เพื่อตรวจวัดระดับของยูเรทในกระแสเลือดและปัสสาวะ ซึ่งจำเป็นสำหรับการตรวจวินิจฉัยการเกิดโรคเก๊าท์ (gout) ในผู้ป่วยจากการสะสมของยูเรท นอกจากนี้ยังใช้เป็น protein drug สำหรับการรักษาโรค hyperuricemia ตัวอย่างของเอนไซม์ยูริเคสที่ได้มีการใช้ในทางการค้าได้แก่ Rasburicase (Bomalaski and Clark, 2004; Haidari *et al.*, 2008) พบว่ายูริเคสผลิตจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืช และจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ยูริเคสได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* (Frank and Hahn, 1955) *P. acidovorans* (Sin, 1975) *Arthrobacter globiformis* (Nobutoshi *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* (Hunag and Wu, 2004), นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทบางสกุลสามารถผลิตเอนไซม์ยูริเคสได้ เช่น *Nocardia farcinica* (Ishikawa *et al.*, 2004) และ *Microbacterium* sp. (Zhou *et al.*, 2005, Kai *et al.*, 2008) จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* และ *Saccharopolyspora* ก็มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูริเคสได้ดี โดยสายพันธุ์ R11 คือ *Saccharopolyspora spinosa* และ R58 คือ *S. malaysiensis*

แอคติโนมัยซีท R102 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างกว้าง เมื่อทำการจัดจำแนกโดยด้วยลำดับของ 16S rDNA พบว่าเป็น *S. nivioruber* เป็นที่ทราบกันดีว่าแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากเป็นอันดับหนึ่งและมีฤทธิ์การยับยั้งที่กว้างเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยประมาณไว้ว่าแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆมากกว่า 1 ล้านชนิด (Watve *et al.*, 2001) ตัวอย่างเช่น *S. rimosus* สามารถผลิต oxytetracycline ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม tetracycline สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยสารปฏิชีวนะชนิดนี้สามารถจับกับไรโบโซมยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับ neomycin และ tylosin ซึ่งผลิตโดย *S. fradiae* ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม amino glycoside และ macrolide ตามลำดับ (Kieser *et al.*, 2000)

บทที่ 5

สรุป

จากการคัดแยกเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมจากปลวก *Termes* sp. ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างจากปลวกจากพื้นที่สงวนชีวมณฑล สะแกราซ จังหวัดนครราชสีมา โดยคัดแยกเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมบนอาหาร ISP medium No. 2 โดยมีการเติมยาปฏิชีวนะเช่น ไซโครเฮกซาไมด์ โนโวไบโอซิน และนาลิดีซิก เป็นต้น ร่วมกับการบำบัดด้วยฟีนอล ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ลดจำนวนของเชื้อในสกุล *Streptomyces* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ รวมทั้งเพิ่มจำนวนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสายพันธุ์หายาก พบว่าแยกเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมได้จำนวนทั้งสิ้น 83 ไอโซเลท

เมื่อนำเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการย่อยสารทดสอบจำนวน 9 ชนิดได้แก่ กรดยูริก โปรตีน ไขมัน ไซแลน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) อะโวเซลเซลลูโลส แป้งดิบ แป้งมันสำปะหลัง และลิกนิน พบว่ามีแอสเพอร์จิลลินัมจำนวน 75 ไอโซเลทมีความสามารถย่อยสลายสารทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด มีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้นที่ไม่สามารถย่อยสลายสารทดสอบใดได้เลย ในจำนวนนี้พบว่าเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมจากปลวกมีความสามารถสูงในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ได้ดีกว่าสารทดสอบชนิดอื่นๆ โดยมีสายพันธุ์ที่ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง ได้ดีคิดเป็น 84.42%, 75.32% และ 58.44% ตามลำดับ ส่วนการย่อยสลายกรดยูริก และไซแลนมีค่าใกล้เคียงกันที่ 42% และ 48% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่พบไอโซเลทใดมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนิน ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าแอสเพอร์จิลลินัมจากปลวกมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีกว่าการย่อยสลายสารประกอบลิกนินในเซลลูโลส

เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมทั้ง 83 ไอโซเลทได้นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus*, *S. aureus*) แกรมลบ (*E. coli*, *P. aeruginosa*) และเชื้อยีสต์ (*C. utilis*) พบว่ามีเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมจำนวน 77 ไอโซเลท สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด และเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ คิดเป็น 98.7% ในขณะที่มีเชื้อที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 14 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 18.2% นอกจากนี้พบว่ามีเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมเพียง 3

ไอโซเลท คิดเป็น 3.9% เท่านั้นยับยั้งเชื้อยีสต์ซึ่งเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าแอสโคไมซีตจากปลวกนับว่าเป็นแหล่งที่ดีที่สุดสำหรับการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย slide culture technique บนอาหาร ISP medium No.2 โดยศึกษาจากสีสปอร์ สีเส้นใยราบและความสามารถในการสร้างรงควัตถุร่วมกับลักษณะสายสปอร์และโครงสร้างพิเศษอื่นๆ พบว่ามีเชื้อแอสโคไมซีตที่มีลักษณะสายสปอร์ที่ยาวและมีการขดเป็นเกลียวหลายรอบ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* ทั้งสิ้นจำนวน 29 ไอโซเลท ส่วนแอสโคไมซีตที่เหลือจำนวน 54 ไอโซเลทจัดเป็นเชื้อแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายาก โดยประกอบไปด้วยสมาชิกใน 8 สกุลได้แก่ *Microbispora* *Nocardia* *Pseudonocardia* *Microtetraspora* *Actinomadura* *Streptosporangium* *Saccharopolyspora* และ *Agromyces* โดยแอสโคไมซีตสายพันธุ์หายากสกุลที่พบมากที่สุดคือ สกุล *Actinomadura* พบจำนวน 17 ไอโซเลท รองลงมาคือ *Microtetraspora* พบจำนวน 16 ไอโซเลท ส่วนสกุลที่มีความหลากหลายที่สุดคือสกุล *Streptomyces* ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจำนวน 29 ไอโซเลท และสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 10 กลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการจัดแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลเท่านั้น

การจัดจำแนกเชื้อแอสโคไมซีตในระดับสปีชีส์นั้นต้องอาศัยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง แต่ก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแอสโคไมซีตที่มีคุณสมบัติดีจำนวน 3 ไอโซเลท มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ได้แก่เชื้อแอสโคไมซีตที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายกรดยูริกได้ดี เนื่องจากพบว่าปลวกเป็นแหล่งที่ดีของแอสโคไมซีตที่ผลิตเอนไซม์ยูริเคสซึ่งย่อยสลายกรดยูริกมากกว่าแอสโคไมซีตที่แยกได้จากดิน เนื่องจากกรดยูริก เป็นของเสียที่พบมากในลำไส้ปลวก จึงเป็นแหล่งที่ดีที่สุดสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ดี จากการทดลองนี้ได้คัดเลือกเชื้อแอสโคไมซีตจำนวน 2 ไอโซเลทได้แก่ R11 และ R58 ซึ่งเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Saccharopolyspora flava* และ *Streptomyces malaysiensis* ตามลำดับเชื้อแอสโคไมซีตอีก 1 ไอโซเลทที่ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์คือ R102 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างกว้างโดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ดีที่สุด พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces nivioruber*

เอกสารอ้างอิง

กนกกร สีนมา, สาวิตร์ ตระกูลหน้าเลื่อมใส, นภาพรรณ นพรัตนราภรณ์ และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2548.

แอสคิตินอัยสียจากลำไ้ปลวกและการย่อยสารลิกโนเซลลูโลสและกรดยูริค วารสาร
เกษตรศาสตร์ (การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43) ระหว่างวันที่ 1-4
กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มัลลิกา หมูแก้ว. 2550. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 121 หน้า

วชิร ใจภักดี. 2544. **การตัดแยกเชื้อแอสคิตินอัยสียที่สร้างสารต้านทานเชื้อราจากดินในประเทศไทย
และตรวจลำดับเบสของยีน 16S rDNA.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 หน้า

วิทยา มะเสนา. 2536. **จุลชีววิทยาทางดิน.** ภาควิชาปฐพีวิทยา, คณะเกษตรศาสตร์,
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd ed. Wiley&Sons, New York.

Antal N, Fiedler H, Stackebrandt E, Beil W, Stroch K, Zeeck A. **Retymicin, Galtamycin B,
Saquayamycin Z and Ribofuranosylumichrome, novel secondary metabolites from
Micromonospora sp. TU6368.** *J. Antibiot.* 2005; 58(2): 95-102

Aoki H, Sakai H, Koshaka M, Konomi T, Hosoda J, Kubochi Y, Iguchi E. **Nocardicin A, a new
monocyclin b-lactam antibiotic: Discovery, Isolation and Characterization.** *J. Antibiot.*
1976; 29(5): 492-500

Atkey, P.T. and D.A. Wood. 1983. **An electron microscope study of wheat straw composted as
a substrate for the cultivation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*).** *J. Appl.
Bacteriol.*
55: 293-304.

- Atushi, K., J. Azuma and T. Koshijima . 1984. Lignin-carbohydrate complex and phenolic acids in bagasse . *Holzforsch.* 38: 141-149.
- Ayaz E, Sahin A. 2003. The Efficacy of Moxidectin and Doramectin against Gastrointestinal Nematode Infection in Cattle. *Turk J Vet Anim Sci.* 27: 307-310
- Ball, S., C.J. Bessell and Mortimer., A. 1957. The Production of polygenic antibiotics by soil *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of General Microbiology*, 15 : 7176.
- Baltz, R.H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 6: 76-83.
- Bomalaski, J. S. and M. A. Clark, 2004. Serum uric acid lowering therapies: Where are we in anagement of hyperuricemia and the potential role of uricase. *Curr. Rheumat. Reports*, 6: 240-247.
- Bouizgame B, El-Hadrami I, Ouhdouch Y. 2006. Novel Production of Isochainin by a Strain of *Streptomyces* sp. Isolated from Rhizosphere Soil of the Indigenous Moroccan Plant *Argania Spinosa* L. *World J Microb Biotech* 22(5): 423-429
- Breznak, J. A. 1984. Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota, pp 173-203. In. J. M. Anderson, A. D. M. Rayner and D. W. H. Walton, eds. Invertebrate-microbial interaction Cambridge University Press, Cambridge.
- Bruntner C, Binder T, Pathom-aree W, Goodfellow M, Bull AT, Potterat O, Puder C, Horer S, Schmid A, Bolek W, Wagner K, Mihm G, Fiedler H. 2005. Frigocyclinone, a novel Angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J.Antibiot.*; 58(5): 346-349
- Buchert, J., M. Tenkanen, A. Kantelinen and L. Viikari. 1994. Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Biores. Technol.* 50: 65-72.

- Cassinelli G, Cotta E, D'Amico G, Bruna CD, Grein A, Mazzoleni R, Ricciardi ML, Tintinelli R. 1970. Thaimycins, new anthelmintic and antiprotozoal antibiotics produced by *Streptomyces michiganensis* var. *amyolyticus* var. *nona*. *Arch. Microbiol.* 70(3): 197-210
- Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condrón MAM, Teplow DB, Stevens D, Yaver D. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*; 148: 2675-2685
- Cidaria D, Borgonovi G, Pirali G. 1993. AB023, novel polyene antibiotics I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antifungal activity. *J. Antibiot.*; 46(2): 251-254
- Coa, L., Yun, W., Tang, S., Zhang, P., Mao, P., Jing, X., Wang, C. and Lou, K. 2009. Biodiversity and enzyme screening of actinomycetes from Hami lake. *Acta Microbiologica Sinica* 49(3):287-93.
- Crawford, D. L. 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1041-1045.
- Crawford, D. L. and R. L. Crawford. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 714-717.
- Crawford, D. L., R. L. Crawford and A. L. Pometti III. 1977. Preparation of specifically labeled ¹⁴C(lignin) and ¹⁴C(cellulose) lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1247-1251.
- Davis, B., R. Dulbecco, H. Eisen, H. Genberg and W. Wood. 1973. *Microbiology*. 3rd ed. Maryland: Harper and Row Publishing.
- Ezra D, Castillo UF, Strobel GA, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Condrón MAM, Teplow DB, Sear J, Maranta M, Hunter M, Weber B, Yaver D. 2004. Coronamycins, peptide

- antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* . 150: 785-793
- Frandsberg E, Petersson C, Lundgren LN, Schnurer J. 2000. *Streptomyces halstedii* K122 produces the antifungal compounds bafilomycin B1 and C1. *Can. J. Microbiol.* 46(8): 753–758
- Frank, W. and G. E. Hahn, 1995. Uricase chungen zum bakteriellen purin uber den abbau von amino, oxy and methylpurinen durch *Pseudomonas aeruginosa* (B. pyocyaneum) Z. *Physiol. Chem*, 301: 90-106
- Funayama S, Anraku Y, Mita A, Komiyama K, Omura S. 1989. Structural study of isoflavonoids possessing antioxidant activity isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*; 42(9): 1350-1355
- Funayama S, Ishibashi M, Komiyama K, Omura S. 1991. A new antibiotic, Okicenone II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.* 44(8): 819-823
- Gadelhak GG, El-Tarabily KA, Al-Kaabi FK. 2005. Insect control using Chitinolytic soil Actinomycetes as Biocontrol agents. *Int. J. Agr. Biol.* 7(4): 627-633
- Ghazal SA, Bream AS, Abdel-Aziz ZK, Ibrahim SY. 2001. Preliminary studies on insecticidal activities of actinomycete strains propagated on solid and broth media using *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*; 66(2b): 559- 70.
- Gledhill, W. E. & Casida, L. E., Jr (1969). Predominant catalasenegative soil bacteria. III. *Agromyces*, gen. nov., microorganisms intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*. *Appl Microbiol.* 18, 340–349.

- Goldstein BP, Selva E, Gastaldo L, Berti M, Pallanza R, Ripamonti F, Ferrari P, Denaro M, Arioli V, Cassani G. 1987. **A40926, a new Glycopeptide antibiotic with Anti-*Neisseria* activity.** *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 31(12): 1961-1966
- Goodfellow, M. and T. Cross. 1983. **Classification in the Biology of Actinomycetes**, pp. 7-164. In M. Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams eds. Academic Press, London.
- Goodfellow, M. 1985. **The actinomycetes**, pp. 211-231. In N. A. Logan, eds. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic Press, London. 501 p.
- Graf E, Schneider K, Nicholson G, Strobele M, Jones AL, Goodfellow M, Beil W, Sussmuth RD, Fiedler H. 2007. **Elloxazinones A and B, new Aminophenoxazinones from *Streptomyces griseus* Acta 2871.** *J. Antibiot.* 60(4): 277-284
- Graziani EI, Ritacco FV, Bernan VS, Telliez J. 2005. **Phaeochromycins A-E, Anti-inflammatory Polyketides Isolated from the Soil Actinomycete *Streptomyces phaeochromogenes* LL-P018.** *J. Nat. Prod.:* 68 (8): 1262–1265
- Gulve, R. M., and A. M. Deshmukh. 2011. **Enzymatic activity of Actinomycetes isolated from marine sediments.** *Recent Research in Science and Technology.* 3(5): 80-83
- Haidari, F., M. R. Rashidi, S. A. Keshavarz, S. A. Mahboob, M. R. Eshraghian and M. M. Shahi, 2008. **Effects of onion on serum uric acid levels and hepatic xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase activities in hyperuricemic rats.** *Pak. J. Biol. Sci.,* 11: 1779-1781.
- Haider, K. and J. Trojanowski. 1975. **Decomposition of specifically ¹⁴C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as model for lignin degradation by soft and white rot fungi.** *Arch. Microbiol.* 119: 103-106.

- Haider, K., J. Trojanowski and V. Sundman. 1978. Screening for lignin degrading bacteria by means of ¹⁴C-labelled lignin. *Arch. Microbiol.* 119: 103-106.
- Hatsu M, Sasaki T, Miyadoh S, Watabe H, Takeuchi Y, Kodama Y, Orikasa Y, Kajii K, Shomura T, Yamamoto H, Sezaki M, Inouye S, Kondo S. 1990. SF2487, a new polyether antibiotic produced by *Actinomadura*. *J. Antibiot.* 43(3): 259-266
- Hayakawa, M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol.* 22: 12-19.
- Holt, J. G. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 4. ed S. T. Williams and M. E. Sharpe, Baltimore, ind: Williams and Williams.
- Hunag, S. and T. Wu. 2004. Modified colorimetric assay for uricase activity and screen for mutant *Bacillus subtilis* uricase gene following SEP mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, 271: 517-523.
- Imai H, Suzuki K, Morioka M, Numasaki Y, Kadota S, Nagai K, Sato T. 1987. Okilactomycin, a novel antibiotic produced by a *Streptomyces* species I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Characterization. *J. Antibiot.* 60(11): 1475-1482
- Ishikawa, J. A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino and H. Kurita et al., 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101: 14925-14930.
- Isono, K and Suzuki, S. 1979. The polyoxins: Pyrimidine nucleotide peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. *Heterocycles*, 13 : 333-351.
- Iwai, Y. and S. Omura. 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot.* 35: 123-141.
- Jeffrey, K. G. and H. G. Michael. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycetes *Phaenerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1741-1747.

- Kai, L., X. H. Ma, X. L. Zhou, X. M. Jia, X. Li and K. P. Guo. 2008. Purification and characterization of a thermostable uricase from *Microbacterium* sp. Strain ZZJ4-1. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 401-406.
- Kato S. 1994. Novel antioxidants from Microorganisms and their pharmaceutical effects. *Actinomycetologica.*; 8
- Khucharoenphaisan K., P. Siriacha and V. Kitpreechavanich. 2000. Efficiency of xylanase in Bio bleaching of paper mulberry pulp and eukalyptus pulp. International Symposium on Paper Mulberry and Hand-Made Paper For Rural Development, 19-24 March 2000, Bangkok, Thailand.
- Khucharoenphaisan K., S. Tokuyama, K. Ratanakhanokchai and V. Kitpreechavanich. 2010a. Induction and repression of β -xylanase of *Thermomyces lanuginosus* TISTR 3465. *Pak. J. Biol. Sci.* 13(5): 209-215.
- Khucharoenphaisan K., S. Tokuyama and V. Kitpreechavanich. 2010b. Purification and characterization of a high-thermostable β -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. *Mycosci.* 51: 405-410.
- Khucharoenphaisan K. and K. Sinma. 2010c. Isolation and screening of uricase producing actinomyces from termite. 2nd Rajamangala University of Technology Thanyaburi International Conference. 24-26 November, Bangkok, Thailand
- Khucharoenphaisan K. and K. Sinma. 2011. Production and Partial Characterization of Uric Acid Degrading Enzyme from New Source *Saccharopolyspora* sp. PNR11. *Pak. J. Biol. Sci.* 14(3): 226-231.
- Khucharoenphaisan K., U. Puangpetch, K. Puttaraksa and K. Sinma. 2011. Grouping of actinomyces isolated from termites using biochemical character. *J. Biol. Sci.* 11(4): 314-319

- Khucharoenphaisan K., N. Sripairoj and K. Sinma. 2012. Isolation and identification of actinomycetes from termite's gut against human pathogen. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7(1): online first.
- Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Kihara T, Kobinata K, Kusakabe H, Isono K. 1983. New antibiotics, Algacidins A and B. *J. Antibiot.*; 36(12): 1777-1780
- Kim BS, Moon SS, Hwang BK. 1999. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Can. J. Bot*; 77(6): 850-858
- Kimura K, Kanou F, Takahashi H, Esumi Y, Uramoto M, Yoshihama M. 1996. Propeptin, a new inhibitor of Prolyl endopeptidase produced by *Microbispora* I. Fermentation, Isolation and Biological properties. *J. Antibiot.* 59(5): 373-378
- Kita K, Shiomi K, Omura S. 2007. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology.*; 23(5): 223-229
- Kumar SS, Philip R, Achuthakutty CT. 2006. Antiviral property of marine actinomycetes against White Spot Syndrome Virus in Penaeid shrimps. *Current Science.* 91(6): 807-811
- Kuster, E. 1979. Bedeutung der Aktinomycetau für die Abbau von Cellulose, Lignin und Huminstoffen in Boden. 2. Pflanzenernähr. Bodenkol. 142: 365-374.
- Lacey, J. & Goodfellow, M. 1975. A novel actinomycete from sugarcane bagasse: *Saccharopolyspora hirsuta* gen. sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 88, 75-85.
- Lai, Y. Z. and K. V. Sarkanen. 1971. Isolation and structural studies in Lignin, pp.165-240. In K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig, eds. Wiley Inter-Science, New York.

- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G and Marinelli F. 2001. **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79: 399-405.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 399-405.
- Lee SJ, Kim HP, Park BK, Ahn SC, Lee HS, Ahn JS. 1997. **Topical anti-inflammatory activity of dianemycin isolated from *Streptomyces* sp. MT 2705-4.** *Arch. Pharm. Res.* 20(4):372-374.
- Liu H, Qin S, Wang Y, Li W, Zhang J. 2008. **Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil.** *World J. Microbiol. Biotech.*; 24(10): 2243-2248
- MacKenzie, C. R., D. Bilous and K. G. Johnson. 1984. *Purification and characterization of an exo-glucanase from *Streptomyces favogriseus*.* *Can. J. Microbiol.* 30: 1171-1178.
- Mahadevan, B. and D.L. Crawford. 1997. **Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108.** *Enzyme and Microbial Technology*, 20 : 489-493.
- McCarthy, A. J. 1987. **Lignocellulose degrading actinomycetes.** *FEMS Microbiol. Reviews.* 46: 145-163.
- McCarthy, A. J. and P. Broda. 1984. **Screening for lignin degrading actinomycetes and their characterization of their activity against [¹⁴C] lignin labelled wheat lignocellulose.** *J. Gen. Microbiol.* 130: 2905-2913.
- Moore BS, Trischman JA, Seng D, Kho D, Jensen PR, Fenicle W. 1999. **Salinamides, Antiinflammatory depsipeptides from a marine streptomycete.** *J. Org. Chem.*; 61: 1445-1450

- Moreira, A. R., J. A. Phillips and A. E. Humpfrey. 1981. Utilization of carbohydrates by *Thermomonospora* sp. Grown on glucose, cellobiose, and cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1325-1338.
- Muller, J.C., Toome, V., Pruess, D.L., Blount, J.F. and Weigele, M. 1983. A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus* III. *J. Antibiot.*, 36 : 217-225.
- Nobutoshi, K., S. Keisuke, M. Takao, T. Masaki, K. Hitoshi and T. Kazue. 2000. Chemiluminometric determination of uric acid in plasma by closed loop FIA with a coimmobilized enzyme flow cell. *Anal. Sci.*, 16: 1203-1205.
- Norman, A.W., Demel, R.A., Dekruyff, B. and Mvan-Deenen, L.L. 1972. Studies on the Biological properties of polyene antibiotics. *J. Biol. Chem.*, 247 : 1918-1927.
- Ohe, T. and Y. Watanabe. 1980. Purification and properties of urate oxidase from *Streptomyces cyanogenus*. *J. Biochem.* 89: 1769-1776.
- Oishi H, Sugawa T, Okutomi T, Suzuki K, Hayashi T, Sawada M, Ando K. 1970. Insecticidal activity of Macrotetrolide antibiotics. *J. Antibiot.*; XXIII (2): 105-106
- Omura S, Shimizu H, Iwai Y, Hinotozawa K, Otaguro K, Hashimoto H, Nakagawa A. AM2604 A, A new antiviral antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* 1982; 32(12): 1632-1637
- Park JO, El-Tarabily KA, Chisalberti EL, Sivasithamparam K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology.* ; 35: 361-365
- Park, J.O., Tarabily, E. Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Journal of Applied Microbiology*, 35 : 361-365.
- Pasti, M. B. and B. L. Belli. 1985. Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (*Termitidae*) gut. *FEMS Microbiology Letter.* 26: 107-112. Peterson et al., 1984

- Phelan, M. B., D. L. Crawford and A. L. Pometto. 1979. Isolation of lignocellulose decomposing actinomycetes and degradation of specifically ^{14}C -labelled lignocellulose by six selected *Streptomyces* strains. *Can. J. Microbiol.* 25: 1270-1276.
- Radzom M, Zeeck A, Antal N, Fiedler H. 2006. Fogacin, a novel cyclic Octaketide produced by *Streptomyces* strain Tu6319. *J. Antibiot.*; 59(5): 315-317
- Ryu, D. D. Y. and M. Mendels. 1980. Cellulase complex: Biosynthesis and application. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102.
- Sacrament ODR, Coelho RRR, Wigg MD, Linhares LFTD, Santos MGMD, Semedo DSL, DaSilva AJR. 2004. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*; 20(3): 225-229
- Sakai T, Sameshima T, Matsufuji M, Kawamura N, Dobashi K, Mizui Y. 2004. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107 I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Screening. *J. Antibiot.*; 57(3): 173-179
- Samac, D.A., Willert, A.M., McBride, M.J. and Kinkel, L.L. 2003. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfafa. *Applied Soil Ecology*, 22 :55-66.
- Sasarman, A., Horodniceanu, T., Gritaenco, V., Antohi, M. and Surdeanu. 1964. Properties of dwarf colonies of *S. typhimurium* obtained with the use of neomycin and streptomycin. *Archives roumaines de pathologie experimentales et de microbiologie*, 23 : 911-918.
- Sato, K. 1983. Biological properties of kasugamycin. In N. Takahashi (Ed.), *Pesticide Chemistry, Human Welfare and The Environment*. vol. 2. Natural Products, Pergamon Press, Oxford. pp. 293-299.

- Selva E, Gastaldo L, Saddler GS, Toppo G, Ferrari P, Carniti G, Goldstein BP. 1996. Antibiotics A21459 A and B, new inhibitors of bacterial protein synthesis: Taxonomy, Isolation and Characterization. *J. Antibiot.*; 49(2): 145-149
- Shih, H.D., Lui, Y.C., Hsu, F. L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Huang, J.W. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. of Agricul. Food Chem.*, 51 : 95-99.
- Shin-ya K. 1994. Screening of antioxidative agents of microbial origin and their application. *Actinomycetologica*; 8
- Shomura T, Gomi S, Ito M, Yoshida J, Tanaka E, Amano S, Watabe H, Ohuchi S, Itoh J, Sezaki M. 1987. Studies on new antibiotics SF2415. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*; 40(6): 732-739
- Sin, I. L., 1975. Purification and properties of xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas acidovorance*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 410: 12-20.
- Singh SK, Gurusiddaiah S. 1984. Production, purification and characterization of Chandramycin, a polypeptide antibiotic from *Streptomyces lydicus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*; 26(3): 394-400
- Sinma K., T. Tamura, V. Kitpreechavanich and S. Tokuyama. 2008. Phylogenetic study on xylan degrading actinomycetes isolated from termites' gut. The annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan, July 10-11, Fruit Park Fujiya Hotel, Yamanashi, Japan
- Sinma K., V. Kitpreechavanich and S. Tokuyama. 2007. Phylogenetic study on lignocellulosic compound degrading actinomycetes isolated from termites' guts. The *JSPS-NRCT* Concluding Joint Seminar on. Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. October 18-20, Walailak University, Thailand.
- Stackebrandt, E. and C. R. Woese. 1981 The evolution of prokaryotes, pp. 1-31. In M. J. Carlile,

- J. F. Collins and B. E. B. Moseley, eds. **Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey and N. L. Ward Rainey. 1997. **Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.** *Int. J. Sys. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stutzenburger, F. J. and G. Kahler. 1986. *Cellulose biosynthesis during degradation of cellulose derivatives for Thermomonospora curvata.* *J. Appl. Bacteriol.* 61: 225-233.
- Stutzenburger, F. J., D. Lupo. 1986. **pH dependent thermal activation of endo-1,4- β -glucanase in *Thermomonospora curvata*.** *Enz. Microb. Technol.* 8: 205-208.
- Sun C, Wang Y, Wang Z, Zhou J, Jin W, You X, Gao H, Zhao L, Si S, Li X. 2007. **Chemomicin A, a new Angucyclinone antibiotic produced by *Nocardia mediterranei* subsp. kanglensis 1747-64.** *J. Antibiot.*; 60(3): 211-215
- Sundarapandian S, Sundaram MD, Tholkappian P, Balasubramanian V. 2002. **Mosquitocidal properties of indigenous fungi and actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* Say.** *J. Biol. Control*; 16: 89-91
- Taechowisan T, Tuntiwachwuttikul P, Lu C, Shen Y, Lumyong S, Taylor WC. 2007. **Anti-inflammatory Activity of 4-Arylcoumarins from Endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells.** *Immunological Investigations*; 36(2): 203- 211
- Taechowisan T, Wanbanjob A, Tuntiwachwuttikul P, Liu J. 2009. **Anti-inflammatory activity of lansais from endophytic *Streptomyces* sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells.** *Food and agricultural immunology*; 20(1): 67-77
- Takeuchi, S., K. Hirayama, Ueda, K., Sakai, H. and Yonehara, H. 1958. **Blasticin S, a new antibiotics.** *J. of antibiot.* 11 : 1-5.

- Tanaka Y, Komaki H, Yazawa K, Mikami Y. 1997. Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: Producing strain, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*; 50(12): 1036-1041
- Tany K, Matsuzava N, Yano S, Yamaguchi T. 1982. Studies on a new antibiotic M92 produced by *Micromonospora*. *J. Antibiot.*; 35(11): 1430- 1436
- Trojanowski, J., K. Haider and V. Sundman. 1977. Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenol by a *Nocardia sp.* *Arch. Microbiol.* 114: 149-153.
- Vogel, G. D. and C. Van der drift. 1976. Degradation of purines and pyrimidines by microorganism. *Bacteriological Reviews.* 40: 403-468.
- Waksman, S.A. and Lechevalier, M.A.. 1962. The actinomycetes vol. III, Antibiotics of Actinomycetes. Williams & Wilkins, Baltimore. 430 p.
- Watanabe, Y., M. Yano and J. Fukumoto. 1969. Studies on the formation of uricase by *Streptomyces* Part I the effect of purine base on the induced formation of uricase by the cultured cells. *Agr. Biol. Chem.* 33: 1282-1290.
- Watanabe, Y., N. Shinzato and T. Fukatsu. 2003. Isolation of actinomycetes from the termites' guts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1801-2003.
- Watve, M.G., R. Tickoo, M.M. Jog and B.D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch. Microbiol.* 176: 386-390.
- Wu Y, Lu C, Quin X, Huang Y, Shen Y. 2009. Diversities Within Genotypes, Bioactivity and Biosynthetic Genes of Endophytic Actinomycetes Isolated from Three Pharmaceutical Plants. *Current Microbiology.* ; 59(4): 475-482
- Xiong L, Li J, Kong F. 2004. *Streptomyces sp.* 173, an insecticidal microorganism from marine. *Letters in Applied Microbiology.*; 38(1): 32-37

- Zhang, Z., Y. Wang and J. Ruan. 1998. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 411-422.
- Zhou, X., X. Ma, G. Sun, X. Li and K. Guo, 2005. Isolation of a thermostable uricase producing bacterium and study on its enzyme production conditions. *Proc. Biochem.*, 40: 3749-3753.
- Zimmermann, W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.* 13: 119-130.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Humic acid vitamin agar (HV agar)

Humic acid (dissolved in 10 ml. of 0.2 N. NaOH)	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
KCl	1.7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	0.02 g
Agar	18 g
Distilled water	1,000 ml
B vitamin	20 ml
Cyclohexamide	50 mg
pH	7.2

B vitamin

thiamine-HCL	0.5 mg.
riboflavin	0.5 mg.
niacin	0.5 mg.
pyridoxin-HCL	0.5 mg.
Ca-pantothenate	0.5 mg.

inositol	0.5 mg.
p-aminobezoic acid	0.5 mg.
biotin	0.25 mg.

2. Yeast extract-malt extract agar (ISP medium No. 2)

Yeast extract	4.0 g
Malt extract	10.0 g
Dextrose	4.0 g
Agar	18.0 g
Distilled water	1,000 ml