

รายงานการวิจัย

เรื่อง

อนุกรมวิธานและสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินพื้นที่พรุเขต
อบอู่และดินป่าพรุของประเทศไทย

**Taxonomy and secondary metabolites of actinomycetes from temperate
peat bog and peat swamp forest soils of Thailand**

โดย

ผศ.ดร. จิตติ ทำไ้

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2550-2551

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550-2551 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ทำไ้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	อนุกรมวิธานและสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน พื้นที่พรุเขต อบอุ่นและดินป่าพรุของประเทศไทย
(ภาษาอังกฤษ)	Taxonomy and secondary metabolites of actinomycetes from temperate peat bog and peat swamp forest soils of Thailand
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณ แผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550-2551 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน
ประจำปี 2550-2551	เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี	จำนวนเงิน 400,000 บาท
ผู้ดำเนินการวิจัย	เดือนตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2552 ผศ.ดร. จิตติ ทาไว
โทรศัพท์	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ 02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 58 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณป่าพรุในจังหวัด
ชุมพรและเชียงใหม่ เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางฟีโนไทป์ได้เป็น 12 กลุ่ม
จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางฟีโนไทป์
ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นเป็นสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล
Streptomyces *Agromyces* *Dactylosporangium* *Micromonospora* *Microbispora* และ
Planotetraspora การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต CM2-8 และ CM2-12 แสดงลักษณะทางสัณฐาน
วิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Micromonospora* แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และฟีโน
ไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* ดังนั้น
เชื้อไอโซเลต CM2-8 และ CM2-12 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสกุลใหม่ของวงศ์
Micromonosporaceae โดยให้ชื่อว่า *Actinuarispora siamensis* นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อ
ตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์
พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 40.3 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี น้ำหมักเชื้อ
ของเชื้อตัวแทนไอโซเลต CP1-3 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี
ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสารแอคติโนมัยซิน ดี (actinomycin D)

จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัย
สปีทในบริเวณป่าพรุของประเทศไทยมีค่อนข้างสูงและควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญใน
การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสปีทต่อไป

Abstract

Fifty eight actinomycete strains were isolated from the peat swamp forest soil samples. These strains were grouped by using phenotypic characteristic into 12 groups. Phylogenetic, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to members of the genera *Streptomyces*, *Agromyces*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Microbispora* and *Planotetraspora*. Here, we found the strains CM2-8 and CM2-12 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genera *Micromonospora* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Micromonospora*. Therefore, the strains CM2-8 and CM2-12 were judged to represent a novel genus of the family *Micromonosporaceae* for which the name *Actinuarispora siamensis* was proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 40.3 % of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate CP1-3 yielded known actinomycin D. Based on these results, it could be concluded that actinomycete diversity in the peat swamp forest soil is very great and should represent an excellent source for discovery of bioactive compounds.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	11
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	93
เอกสารอ้างอิง	95

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP4-3 บนอาหาร ISP2	19
2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP5-1 บนอาหาร ISP2	21
3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP1-1 บนอาหาร ISP2	23
4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP4-3, CP5-1 และ CP1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	25
5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CH9-5 บนอาหาร ISP2	26
6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP1-2 บนอาหาร ISP2	28
7 แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต CP6-3 บนอาหาร ISP2	30
8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH9-5, CP1-2 และ CP6-3 บน phylogenetic tree (NJ method)	32
9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP3-5 บนอาหาร ISP2	33
10 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต CP1-3 บนอาหาร ISP2	35
11 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP1-3 บน phylogenetic tree (NJ method)	37
12 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต CH11-1 บนอาหาร ISP2	38
13 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP3-5 และ CH11-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	40
14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CH8-5 บนอาหาร ISP2	41
15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH8-5 บน phylogenetic tree (NJ method)	43
16 แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต CH10-9 บนอาหาร ISP2	44
17 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH10-9 บน phylogenetic tree (NJ method)	46
18 แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต CM2-8 บนอาหาร ISP2	47
19 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CM2-8 บน phylogenetic tree (NJ method)	49
20 แสดงโครงสร้างทางเคมีและ ¹ H NMR spectrum ของสาร CP1-3-001	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ	4
2 แสดงสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากนอกเหนือจากสกุล <i>Streptomyces</i>	6
3 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ	9
4 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้	18
5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	50
6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต	80
7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต	82
8 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้น เอทิลอะซีเตตด้วยวิธี Agar disc diffusion	85
9 ^1H และ ^{13}C NMR spectral (in CDCl_3) of CP1-3-001 และ actinomycin D	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมีไมซีเลียมแตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอกติโนมัยสีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยสีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยสีททั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspera*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérday, 2005)

จากข้อมูลจะเห็นว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากสกุลอื่น ๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติใหม่ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากสกุลอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากสกุล *Streptomyces* รวมทั้งสกุล *Streptomyces* จากแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มนี้ โดยเห็นว่า ป่าพรุ (Peat swamp forest) รวมถึงพื้นที่พรุเขตอบอุ่น (Temperate peat bog) เป็นแหล่งทรัพยากรป่าไม้ที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งในประเทศไทยซึ่งยังมีการศึกษา และทำการวิจัยทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อต่างๆ เพียงเล็กน้อย

ป่าพรุ (Peat Swamp forest) เป็นป่าที่ลุ่มชุ่มน้ำหรือมีน้ำจืดแช่แข็งขึ้นอยู่ในพื้นที่เป็นแอ่งรูปกระทะได้รับน้ำจากฝนเป็นส่วนใหญ่ทำให้มีน้ำจืดแช่แข็งตลอดปี มีซากพืชทับถมกันเป็นเวลานานโดยผุสลายช้ามาก และมักขังติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจมีการแห้งแล้งในบางครั้งแต่ดินยังคงชื้นจัด มีซากพืชของพืชทับถมหนา เวลาเหยียบมีความหยุ่น สภาพดินพรุมีการทับถมของซากพืช เรียกว่า ดินอินทรีย์ (organic soils) หรือ ดินชุดนราธิวาส (Narathiwat series) ซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมถ้าหากสลายหมดจนไม่เห็นซากพืชเรียก มัค (muck) ถ้าสลายไม่หมดมองเห็นซากพืชเรียก พีท (peat) ดินพรุส่วนใหญ่หนามากกว่า 40 เซนติเมตร บาง

แห่งอาจถึง 2 เมตร มีสีดำหรือน้ำตาลแก่ ดินเป็นกรดปานกลางในชั้นบนและกรดจัดในชั้นล่าง ตามปกติค่าความเป็นกรด-ด่างของดินจะแปรผันอยู่ในช่วง 4.5-6.0 (อุทิส. 2528)

เนื่องจากป่าพรุ และ/หรือ พื้นที่พรุมีสภาพที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต หรือดำรงชีพของ จุลินทรีย์ทั่วไป เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ต้องมีการปรับตัวเป็นพิเศษเพื่อที่จะอาศัยอยู่ในสภาพที่ไม่เอื้ออำนวยนี้ ดังนั้นประชากรของเชื้อที่อาศัยอยู่ในบริเวณเขตป่าพรุจึงน่าจะมีความแตกต่างไปจากแหล่ง ธรรมชาติอื่น ทำให้เกิดความสนใจ ที่จะทำการวิจัยทางด้านอนุกรมวิธานและสสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าพรุ และ/หรือพื้นที่พรุของประเทศไทยทั้งป่าพรุทางภาคใต้บริเวณจังหวัด ชุมพร และพื้นที่พรุในอำเภอพร้าวกะ และบนยอดคอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่พรุที่มีลักษณะ และแตกต่างไปจากพื้นที่พรุในบริเวณทั่วไป โดยเฉพาะพื้นที่พรุบริเวณอ่างกาใต้ยอดคอยอินทนนท์ จัดได้ว่าเป็นระบบนิเวศของป่าเขตอบอุ่นที่สำคัญของประเทศไทย โดยพื้นที่พรุ (bog) เกิดจากการทับถมของมอสชนิด ต่างๆ โดยเฉพาะ "ข้าวตอกฤๅษี" (sphagnum) และเศษซากพืชชนิดต่าง ๆ ที่ขึ้นอยู่โดยรอบ ตรงกลางพรุจะเป็น แอ่งน้ำที่เกิดจากน้ำซับอันเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่กลาง สภาพพื้นที่จะหนาแน่นและชุ่มชื้นมาก ตามลำต้น ของต้นไม้โดยรอบจะถูกห่อหุ้มด้วยมอส เฟิร์น กล้วยไม้และพืชอิงอาศัย (epiphytes) ชนิดอื่น ๆ ด้วยลักษณะ อันจำเพาะของป่าที่แตกต่างจากป่าอื่นอาจส่งผลให้การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อ สายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนเพิ่มสูงขึ้น และเนื่องจาก ปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนานาชนิดได้พัฒนาตัวเองจนสามารถต้านยาปฏิชีวนะที่ ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมาก ขึ้น ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องดำเนินต่อ

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารที่สกัดได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่ง สำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ สำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรค ดังกล่าว จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า เชื้อแอคติโนมัย ซีทจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์แหล่งสำคัญ เนื่องจากเป็น กลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและโอกาสที่จะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ยังคง มีอยู่สูง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารที่ มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากป่าพรุ และ /หรือพื้นที่พรุในบริเวณที่กล่าวมา เพื่อรวบรวมนำมาศึกษาอนุกรมวิธานใน ระดับสกุลเป็นส่วนใหญ่และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับ สปีชีส์รวมทั้งศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าว ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสาร ทุติยภูมินั้น ซึ่งจะเป็ข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาทางจุลชีววิทยาและเคมี เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทหายากจากดินป่าพรุจังหวัดชุมพรและเชียงใหม่ และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้
- 1.2.3 เพื่อทำการสกัดแยกสารทุติยภูมิจากการหมักของเชื้อไอโซเลตที่คัดเลือก รวมทั้งศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่แยกได้
- 1.2.4 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทุติยภูมิที่แยกได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากป่าพรุ และ/หรือพื้นที่พรุ เพื่อรวบรวมนำมาศึกษาอนุกรมวิธานในระดับสกุลเป็นส่วนใหญ่และคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อ รวมทั้งทำการสกัดแยกสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าว ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารทุติยภูมินั้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์

ได้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ใน กลุ่มแอคติโนมัยสีท ที่มีความสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง หรือค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยค้นพบมาก่อน ตลอดจนสามารถตรวจสอบหรือค้นพบสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้ดีเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาต่อไปในอนาคต

การค้นพบทั้งเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณสูง ถือเป็นแหล่งทุนสำคัญที่สามารถนำไปใช้เป็นผู้ผลิตสารเริ่มต้นเพื่อนำไปดัดแปลงโครงสร้างโดยกระบวนการทาง เคมี และ /หรือชีวสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นยาปฏิชีวนะได้ ตลอดจนการตรวจสอบหรือค้นพบสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ จะเป็นจุดเริ่มต้นในการดัดแปลงเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อใช้บำบัดรักษาโรคติดเชื้อยาได้ต่อไปในอนาคต ผลสำเร็จของการวิจัยในครั้งนี้จึงถือเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นในการร่วมวิจัยกับหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor และวารสารในประเทศได้

1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวิทยาศาสตร์สาธารณสุขด้านการค้นคว้าวิจัยหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อโรคดื้อยาที่เป็นปัญหาสาธารณสุขปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ เป็นงานวิจัยพื้นฐาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่หายากมีหลายสกุลและสามารถค้นพบได้มากขึ้นเนื่องจากมีเทคนิคใหม่ในการแยกเชื้อที่จำเพาะ ยังผลให้การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดคือเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Bérdy, 2005)

<i>Streptomycetaceae:</i>		<i>Thermomonosporaceae:</i>	
<i>Streptomyces</i>	~8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatosporia</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Micromonosporaceae:</i>		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
(<i>Actinoplanetes</i>)		<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Thermopolyspora</i>	1
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Dactylosporangium</i>	58		
<i>Micromonosporaceae</i> (ต่อ)		<i>Mycobacteriaceae:</i>	
<i>Ampullariella</i>	9	(<i>Actinobacteria</i>)	
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Nocardia</i>	(357)
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Arthrobacter</i>	25
		<i>Brevibacterium</i>	17

<i>Pseudonocardiaceae:</i>		<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Amycolatopsis/Nocardia</i>	120/357		
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Other (unclassified) species:</i>	
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycolata</i>	12	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Frankia</i>	7
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Westerdykella</i>	6
		<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Streptosporangiaceae:</i>		<i>Synnenomyces</i>	4
(<i>Maduromycetes</i>)		<i>Sebekia</i>	3
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Excelsospora</i>	3
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Waksmania</i>	3
<i>Planobispora</i>	10	<i>Alkalomyces</i>	1
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Catellatospora</i>	1
<i>Planomonospora</i>	2	<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1

ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces*

Compounds	Strains	Activity	References
SF 2809	<i>Dactylosporangium</i> sp.	Chymase inhibitor	Tani <i>et al.</i> , 2004
Madurastatins A ₁ , A ₂ , A ₃	<i>Actinomadura madurae</i> IFM 0745	Antibacterial activity	Harada <i>et al.</i> , 2004
Diketopiperazine Sch 725418	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Yang <i>et al.</i> , 2004
Ansamitocin	<i>Actinosynnema pretiosum</i>	Antibacterial activity	Lu <i>et al.</i> , 2004
IB-0028	<i>Actinomadura</i> sp.	Cytotoxic activity	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2003
Nocathiacin I, II, III	<i>Nocardia</i> sp. WW-12651	Antibacterial activity	Li <i>et al.</i> , 2003
3-O-mycarosylerythronolide B	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Antibacterial activity	Cevallos <i>et al.</i> , 2003
Chandrananimycins A-C	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacterial activity	Rajendra <i>et al.</i> , 2003
Bafilomycin C1	<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	Antibacterial activity	Moon <i>et al.</i> , 2003
R 176502	<i>Micromonospora</i> sp.	Antimicrobial activity	Laakso <i>et al.</i> , 2003
Kosinostatin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Furumi <i>et al.</i> , 2002
Hibarimicins	<i>Microbispora</i> sp.	Anticancer activity	Cho <i>et al.</i> , 2002
Propeptin	<i>Microbispora</i> sp.	Prolyl Endopeptidase inhibitor	Esumi <i>et al.</i> , 2002
SB-219383	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial activity	Greenwood <i>et al.</i> , 2002
Isochromanquinone	<i>Micromonospora</i> sp. SA246	Cytotoxic activity	Yeo <i>et al.</i> , 2002
Asterobactin	<i>Nocardia asteroides</i>	Antibacterial activity	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Cetoniacytone A	<i>Actinomyces</i> sp.	Cytotoxic activity	Schlorke <i>et al.</i> , 2002
Dithiolopyrrolone	<i>Saccharotrix</i> sp. SA233	Antimicrobial activity	Lamari <i>et al.</i> , 2002
Fluoroindolocarbazoles	<i>Saccharotrix aerocolonigenes</i>	Antibacterial activity	Lam <i>et al.</i> , 2001
Ammocidin	<i>Saccharotrix</i> sp.	Apoptosis inducer	Murakami <i>et al.</i> , 2001
Plaraflavins	<i>Saccharotrix</i> sp.	Antitumor	Vertesy <i>et al.</i> , 2001
Tyropeptins A and B	<i>Kitasatospora</i> sp. MK 993-df2	Proteasome inhibitor	Momose <i>et al.</i> , 2001
Brasilinolide B	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Antifungal	Mikami <i>et al.</i> , 2000
Arisostatin A and B	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi <i>et al.</i> , 2000
Nocardiones A and B	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0248	Tyrosine phosphatase inhibitors	Otani <i>et al.</i> , 2000

Compounds	Strains	Activity	References
IB-96212 [1]	<i>Micromonospora</i> sp. L-25-ES25-008	Cytotoxic activity	Chimeno <i>et al.</i> , 2000
SB-219383 [2]	<i>Micromonospora</i> sp. SB-219383	Tyrosyl t RNA synthetase inhibitor	Stefanska <i>et al.</i> , 2000
Aristostatins A and B [3]	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0316	Antibacterial activity	Igarashi <i>et al.</i> , 2000
4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine, 5'-Hydroxystaurosporine [4]	<i>Micromonospora</i> sp. L-31-CLCO-002	Antitumor activities	Hernandez <i>et al.</i> , 2000
GTRI-02 [5]	<i>Micromonospora</i> sp. SA246	Lipid peroxidation inhibitor	Yeo <i>et al.</i> , 1998
YM-47515 [6]	<i>Micromonospora echinospora</i> subsp. <i>echinospora</i>	Antimicrobial activities	Sugawara <i>et al.</i> , 1997
Thiocoraline [7]	<i>Micromonospora</i> sp. L-13-ACM2-092	Antimicrobial activities	Romero <i>et al.</i> , 1997
1-Hydroxycrisamicin A [8]	<i>Micromonospora</i> sp. SA246	Antimicrobial activities	Yeo <i>et al.</i> , 1997
Pyrolosporin A [9]	<i>Micromonospora</i> sp. C39217-R109-7	Antimicrobial activities	Lam <i>et al.</i> , 1996
Antascomicins A, B, C, D and E [10]	<i>Micromonospora</i> sp.	Antagonize the immunosuppressive activity	Fehr <i>et al.</i> , 1996
Macquarimicin A [11], B [12], C [13] and Cochleamycin A [14]	<i>Micromonospora chalicea</i>	Antileukemia cell line P-388	Hochlowski <i>et al.</i> , 1996
Cororubicin [15]	<i>Micromonospora</i> sp. JY16	Cytotoxic activity	Ishigama <i>et al.</i> , 1994
16-membered lactone compound and izenamycin B ₂ and B ₃ [16]	<i>Micromonospora</i> sp. YS-02930K	-	Yasumuro <i>et al.</i> , 1994
Mycinamicin I and II [17]	<i>Micromonospora griseorubida</i> (FERM BP-705)	Antibacterial activity	Kinoshita <i>et al.</i> , 1992
Sibanomicin [18]	<i>Micromonospora</i> sp. SF2364	Antitumor activities	Itoh <i>et al.</i> , 1990
Dynemicins O [19], P [20], Q [21]	<i>Micromonospora chersina</i> M956-1	Antibacterial activity, Antitumor activity	Saitoh <i>et al.</i> , 1991
Citreamicin [22]	<i>Micromonospora citrea</i>	Antibacterial activity	Carter <i>et al.</i> , 1990
K-259-2 [23]	<i>Micromonospora olivasterospora</i> K-259	Inhibitor of Ca ²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase	Matsuda <i>et al.</i> , 1987
K-13 [24]	<i>Micromonospora halophytica</i> subsp. <i>exilisia</i> K-13	enzyme inhibitor	Kase <i>et al.</i> , 1987
Antromicin [25]	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Antibacterial activity	Odakura <i>et al.</i> , 1984
Sagamycin	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Antibacterial activity	Odakura <i>et al.</i> , 1983

เนื่องจากปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคร้ายจำนวนมากได้พัฒนาตัวเองจนสามารถต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องดำเนินต่อไป

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารที่สกัดได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ สำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคดังกล่าว จากข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงนั้นพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสิตเป็นแหล่งสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและโอกาสที่จะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ยังคงมีอยู่สูง

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์เหล่านั้น ซึ่งคาดว่าการศึกษาในครั้งนี้ อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสิตที่น่าสนใจหรือเป็นเชื้อชนิดใหม่เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ รวมทั้งอาจค้นพบสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี หรือสารชนิดใหม่ ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยาปฏิชีวนะและการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตได้ต่อไปในอนาคต จึงนับเป็นการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ธรรมชาติให้ก่อประโยชน์ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนามาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมของชาติ

ปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้นทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังที่ปรากฏในข่าวจากสื่อต่างๆ ของการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคร้ายชนิดใหม่ยังผลให้เกิดการเสียชีวิต ทรัพย์สิน และเศรษฐกิจทางการเกษตรโดยรวม แนวทางแก้ปัญหาแนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติ ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อโรคดื้อยาเหล่านั้น จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ (Bérdy, 2005)

Source	Antibiotics	“Other bioactive” metabolites	Total bioactive metabolites	Practically used (in human therapy)	Inactive metabolites
Bacteria	2900	900	3800	10~12(8~10)	3000 to 5000
<i>Actinomycetales</i>	8700	1400	10100	100~120(70~75)	5000 to 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35(13~15)	2000 to 15000
Total	16500	6000	22500	140~160 (~100)	20000to 25000

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะเนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนิคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอกติโนมัยซีท นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัย ซีท ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983)

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทในระดับสกุลและสปีชีส์อาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่ 1) เช่น Cell wall chemotype, Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบชีวสารสนเทศ (Bioinformatic) มาเพื่อช่วยตัดสินใจการจำแนกอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

การค้นพบยาสชนิดต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีประวัติความเป็นมายาวนานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และพืชซึ่งอาจได้จากการผ่าเหล่า (mutation) หรือจากวิวัฒนาการ หรือได้จากกระบวนการ

detoxification การมีแหล่งจุลินทรีย์ที่ไม่จำกัดจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย หรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินป่าพรุ และ /หรือพื้นที่พรุอาจจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิม ยังผลให้มีโอกาสในการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากน้ำหมักเชื้อเพิ่มสูงขึ้น และคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช เพื่อให้พื้นฐานในการพัฒนางานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขของประเทศชาติมั่นคงและนำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณผิวหน้าและด้านล่าง (ลึกลงไปประมาณ 30-50 เซนติเมตร) และดินทั่วไปในบริเวณเขตป่าพรุทางภาคใต้บริเวณจังหวัดชุมพร ตลอดจนพื้นที่พรุในอำเภอพร้าวกะทิงและบนยอดดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัดความเป็นกรด-ด่างของดินตามวิธีของ Enokita *et al.* (1986)

3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแอกติโนมัยสีท ทำโดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสกุลนั้นๆ จากนั้นทำการแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora *et al.*, 1995) โดยนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า คูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

3.1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ จากการศึกษานี้จะสามารถคัดเลือก

เชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และนำเชื้อ ออกแอคติโนมัยสีทที่มีศักยภาพในการยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาทำการจัดกลุ่ม โดยการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานต่อไป

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลาย น้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลาย แป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ การผลิตเมลานิน การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด -ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดระเบียบเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีต่อไป

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว Yeast extract – Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทำ การเก็บเกี่ยวเชื้อโดยการ centrifuge และทำให้เซลล์แห้ง ภายใต้อุณหภูมิเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

ตรวจสอบ Diaminopimelic acid ของเชื้อ โดยสลายเซลล์แห้งด้วย 6N HCl ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC (Merck No. 5716) Develop ด้วย methanol - water - 6N HCl - pyridine(80:26:4:10) ใช้ 0.5% ninhydrin solution ใน n-butanol ฟัน แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)₂ และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอา

supernatant มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่เกิดกับ standard

3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

เตรียม polar lipid จากการสกัดเซลล์แห้งด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย chloroform กรองกากเซลล์ (debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และดูสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 10x10 cm) ทำการ develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform - methanol - water (65:25:4) และ chloroform - acetic acid - methanol - water (80:18:12:5) แล้วฟันด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน จากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography

3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2:1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck no. 1.05715 Kieselgel 60 F₂₅₄, 20x20 cm) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดย BLAST n program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka, J., 1994.)

3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract – Malt extract broth เป็นเวลา 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อ และล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และโปรตีน ด้วยการเติม RNase solution และ proteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ -20°C องศาเซลเซียส ใน ethanol

3.2.4.2 การวิเคราะห์

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส $10\ \mu\text{l}$ heated DNA ($1\ \text{mg/ml}$) ด้วย $10\ \mu\text{l}$ nuclease P_1 บ่มที่อุณหภูมิ 50°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลสต่อด้วย $10\ \mu\text{l}$ alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

หยด $100\ \mu\text{l}$ ของสารละลาย heat – denatured DNA ($1\ \mu\text{g DNA / well}$) ของ type strain, control DNA (calf thymus หรือ *E. coli*) และ DNA ของเชื้อ unknown บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วทดสอบละลาย DNA นั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปล่อยให้แห้งที่ $45-60^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส

3.2.5.2 DNA labeling with photobiotin (DNA probe)

เตรียมสารละลาย DNA ของ type strain ในหลอด eppendorf เติมสารละลาย photobiotin ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอด sunlamp เติม $0.1\ \text{M Tris-HCl buffer (pH 9.0)}$ และ n-butanol ปั่นด้วย vortex ปั่นเหวี่ยงที่ $12000\ \text{rpm}$ นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำ DNA ที่ติดฉากแล้วไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วและนำไป sonicate แล้วนำไปผสมกับ hybridization solution

3.2.5.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วทดสอบละลายทิ้ง

3.2.5.4 Hybridization

หยดสารละลายที่ผสม DNA probe ของ type strain ลงแต่ละหลุม ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 12 ชั่วโมง แล้วทดสอบละลายทิ้ง

3.2.5.5 Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X – 100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลาย I ทิ้ง

Colorimetric method : เติมสารละลาย streptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น เติมสารละลาย tetramethyl benzidine – H₂O₂ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิด สารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยุดปฏิกิริยาด้วย สารละลาย 2M H₂SO₄ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบ เป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการ ดังที่กล่าวมา

หมายเหตุ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในระดับสกุลจะใช้การศึกษาทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี ได้แก่ การวิเคราะห์ผนังเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ และ การศึกษาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene เป็นหลัก

3.3 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่อง เขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO₃) โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

3.4 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้ แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำ สิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและนำมาสกัดแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค ทางโครมาโตกราฟี พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพควบคู่กันไป (bioassay – guided fractionation)

3.5 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาพิสูจน์โครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี รวมทั้งกำหนดเอกลักษณ์ และหาค่าคงที่ทางกายภาพที่สำคัญ เช่น จุดหลอมเหลว เป็นต้น เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่

3.5.1 Ultraviolet – Visible (UV) spectrophotometry

วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น ultraviolet (200-400 นาโนเมตร) จนถึง visible (400-800 นาโนเมตร) จะทำให้ทราบถึงหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดสีหรือดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าว หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ ได้แก่ หมู่คาร์บอนิล หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะมิโน เป็นต้น

3.5.2 Infrared spectrophotometry (IR)

วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความถี่คลื่น infrared ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของแสงที่สามารถทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน และสามารถบอกถึงหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ซึ่งมีการสั่นสะเทือนในรูปแบบจำเพาะเมื่อได้รับพลังงานจากแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง นอกจากนี้จะใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงแล้วสเปกตรัมที่ได้จะนำมาใช้อ้างอิงเพื่อช่วยในการกำหนดเอกลักษณ์ของสารแต่ละชนิด เนื่องจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสารแต่ละชนิดจะมีเอกลักษณ์ที่เฉพาะตัว และใช้เป็น finger print ของสารนั้นๆ ได้

3.5.3 Mass spectrometry (MS)

หาน้ำหนักโมเลกุล และยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร โดยพิจารณาจากลักษณะของโครงสร้างซึ่งทำให้แตกเป็นชิ้นส่วนย่อยๆ แล้วหาน้ำหนักของชิ้นส่วนที่แตกออกนั้นจะปรากฏบนสเปกตรัม พิจารณาจากน้ำหนักของชิ้นส่วนย่อยว่ามีความสัมพันธ์กับโครงสร้างที่ทำนายไว้หรือไม่

3.5.4 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

เป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบถึงโครงสร้างของสารโดยจะใช้ประกอบกันระหว่าง $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy ทั้งแบบ 1-D NMR และ 2-D NMR ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมเหล่านี้จะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอนในโมเลกุล รวมทั้งอิทธิพลของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ในโครงสร้างที่มีผลต่อโปรตอนและคาร์บอน การกำหนดเอกลักษณ์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสเปกตรัม NMR จะประกอบด้วยการกำหนดค่า chemical shift ที่ถูกต้องของโปรตอนและคาร์บอน การอธิบายสาเหตุการเกิด splitting pattern รูปแบบต่างๆ การอธิบายค่า coupling constant รวมทั้งการใช้ปรากฏการณ์ nuclear overhauser effect (NOE) ในการกำหนด configuration และ conformation ของสารที่แยกได้

3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

หลังจากได้สิ่งสกัดในขั้นตอนต่าง ๆ ทางโครมาโตกราฟีแล้ว จะแบ่งสิ่งสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

3.6.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 8.1.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หดยสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μ l/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่าง ดินในบริเวณเขตป่าพรุทางภาคใต้บริเวณจังหวัดชุมพร ตลอดจนถึงพื้นที่พรุในอำเภอพราวนและบนยอดคอคอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยยีสต์และเชื้อแอกติโนมัยยีสต์ หายากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็นกรด -เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยยีสต์ทั้งหมด 58 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.01-7.12 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยยีสต์ที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินชุ่มน้ำ	ชุมพร	5.21	CP1	CP1-1, CP1-2, CP1-3, CP1-4, CP1-5
ดินผสมซากพืช	ชุมพร	6.06	CP2	CP2-7, CP2-8, KB 2-9, CP2-10, CP2-11
ซากใบไม้	ชุมพร	5.83	CP3	CP3-4, CP3-5, CP3-6, CP3-7, CP3-8, CP3-9
ดิน	ชุมพร	5.93	CP4	CP4-1, CP4-3, CP4-6, CP4-7, RB 4-8, CP4-9
ซากเปลือกไม้	ชุมพร	6.84	CP5	CP5-1, CP5-2, CP5-3, CP5-4, CP5-5, CP5-6
ซากใบไม้	ชุมพร	5.01	CP6	CP6-1, CP6-2, CP6-3, CP6-4, CP6-5, CP6-6
ดินใต้น้ำ	ชุมพร	6.33	CP7	CP7-1, CP7-2, CP7-3, CP7-4, CP7-5, CP7-6
ดินชุ่มน้ำ	เชียงใหม่	6.02	CH8	CH8-1, CH8-2, CH8-3, CH8-4, CH8-5, CH8-9, CH8-10
ซากใบไม้	เชียงใหม่	6.86	CH9	CH9-3, CH9-4, CH9-5, CH9-6
ดิน	เชียงใหม่	7.12	CH10	CH10-9
ดินใต้น้ำ	เชียงใหม่	6.19	CH11	CH11-1, CH11-2, CH11-3, CH11-4
ดินผสมซากพืช	เชียงใหม่	6.88	CM2	CM2-8, CM2-12

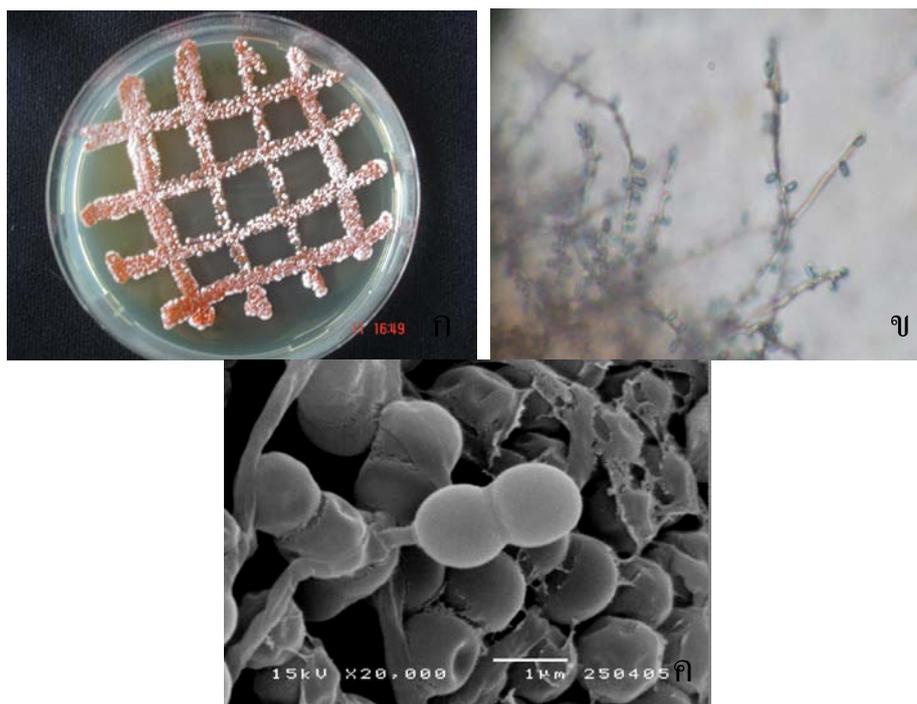
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัย สีททั้งหมด 57 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 12 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัย สีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีชมพู- แดง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 1) เชื้อในกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร YM และ OM เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 6 ไอโซเลต ได้แก่ CP4-3, CP2-8, CP7-2, CH8-1, CH8-2, CH8-3

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 8 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 7) เชื้อกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นน้ำตาล ดี-ไรโบส ดี-ฟรักโทส และ ดี-ไซโลส (ตารางที่ 8)



รูปที่ 1. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP4-3 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

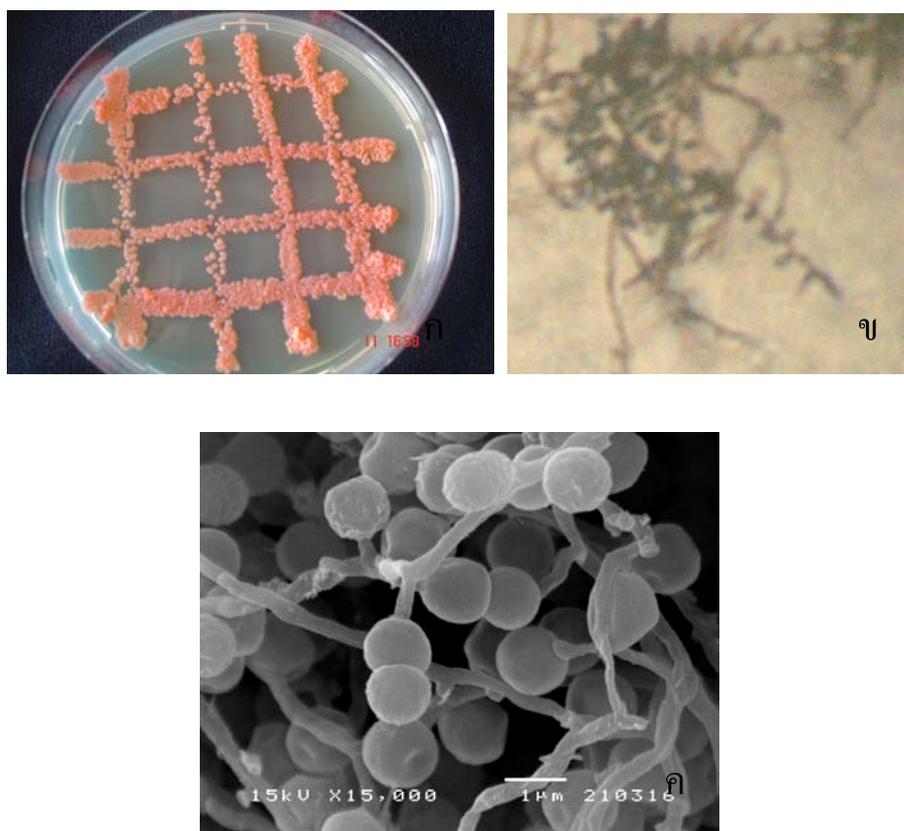
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type 3) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไรโบส มาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และไกลโคฟอสโฟไลปิดที่ให้ผลบวกต่อสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin-positive glycophospholipids) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP4-3

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อ ไอโซเลต CP4-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T (D86936) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 4)

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเหลืองและเส้นใยอาหารสีส้มแดง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิ ดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 2) เชื้อในกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร YM ประกอบด้วย 7 ไอโซเลตคือ CP5-1, CP6-1, CP2-11, CH8-4, CP4-8, CP4-9, CP5-3

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) รวมทั้งสามารถใช้น้ำตาล ดี-แมนนิทอล ดี-เมลลิไบโอส แอล-แรมโนม ดี-ราฟฟิโนส กลีเซอรอล และซาลิซินได้ (ตารางที่ 8)



รูปที่ 2. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP5-1 บนอาหาร ISP2
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

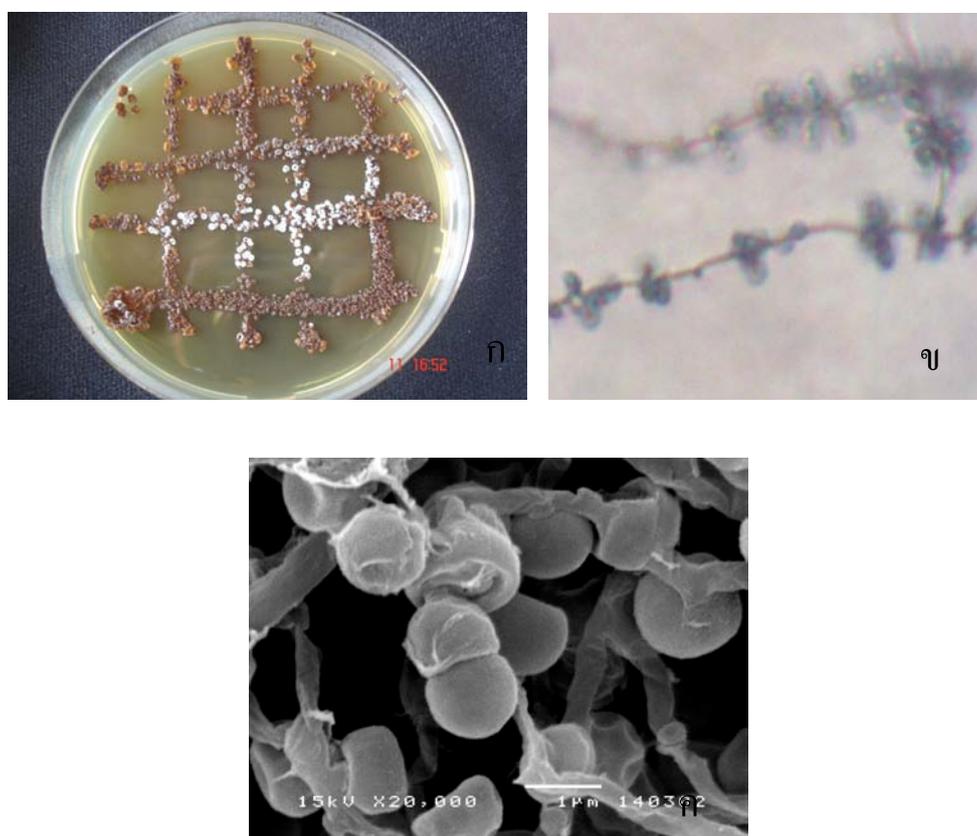
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* (cell wall type 3) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไรโบส มาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP5-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อ ไอโซเลต CP5-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต CP1-1 (ตัวแทนของเชื้อกลุ่มที่ 3) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5 และที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 4) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T (D86936) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 และที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 44 (รูปที่ 4)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัย ลีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม สามารถสร้างรงควัตถุนอาหารสีส้มเหลือง สามารถสร้างสปอร์ที่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 3) และเจริญได้ดีบนอาหาร YM, OM, Glu.A และ NA ประกอบด้วยเชื้อ 6 ไอโซเลตคือ CP1-1, CP3-9, CP7-3, CP7-6, CP2-7, CP2-10

เชื้อในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 พิเศษที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายหรือตกตะกอนโปรตีนในนม เจล าดิน และแป้ง แต่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้ดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-เมลลิไบโอส ดี-รัฟฟิโนส กลีเซอรอล แลคโตส และ แอล-อะราบิโนส (ตารางที่ 8)



รูปที่ 3. ก แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อไอโซเลต CP1-1 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

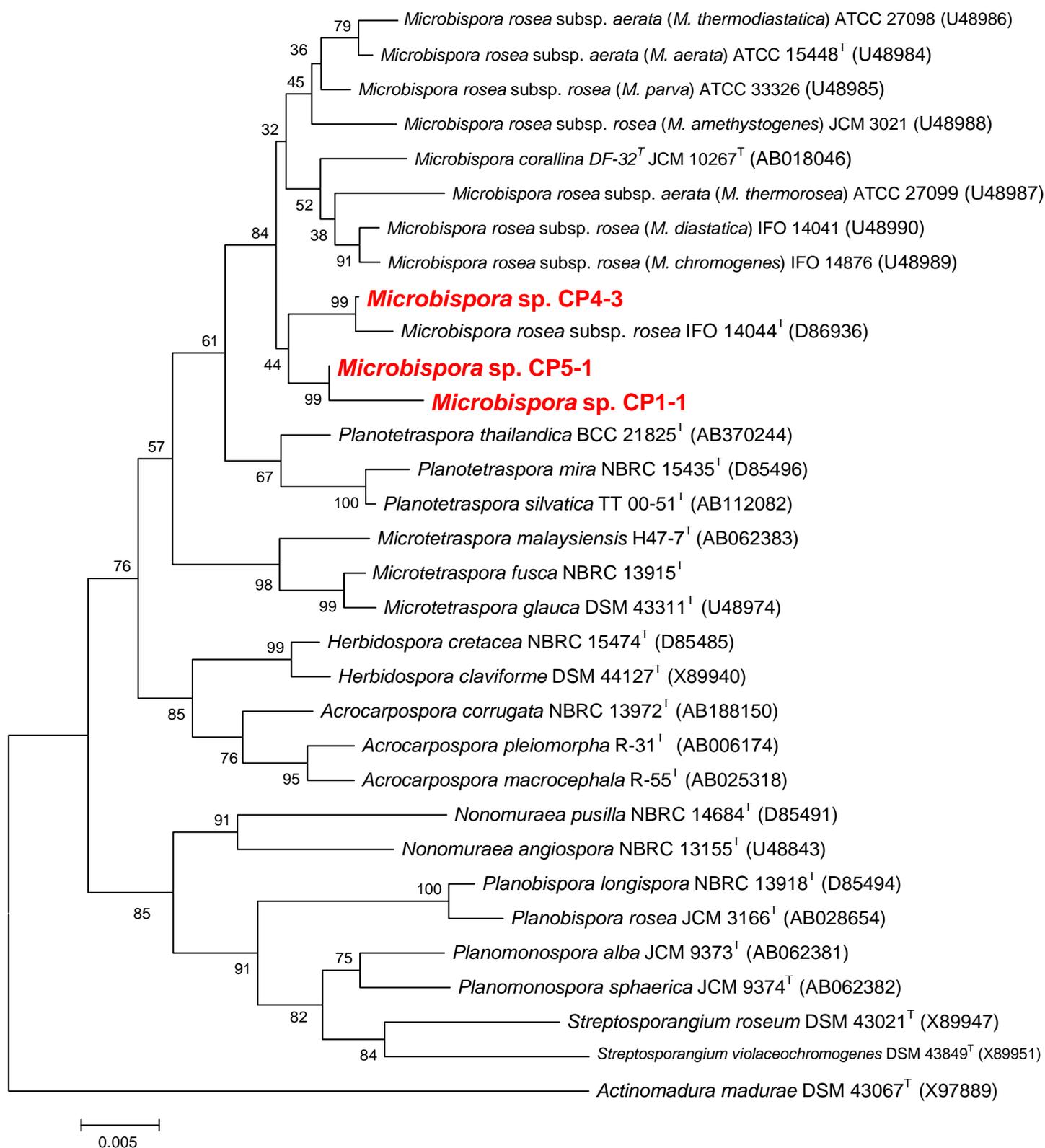
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ meso (cell wall type 3) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP1-1

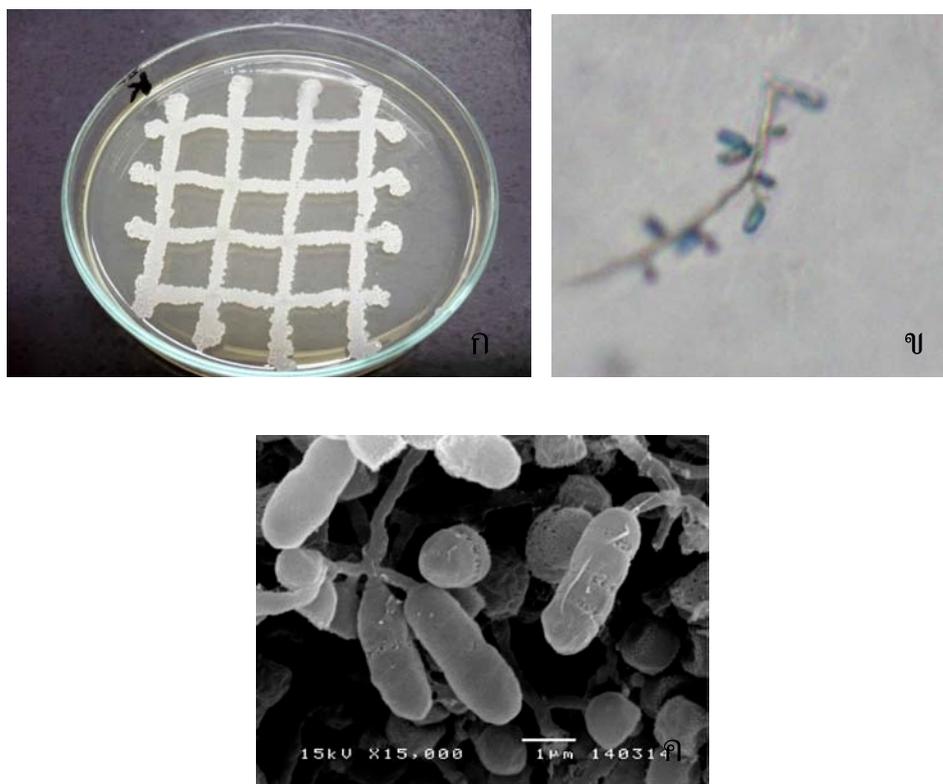
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อ ไอโซเลต CP1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต CP5-1 (ตัวแทนของเชื้อกลุ่มที่ 2) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5 และที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 4) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T (D86936) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.2 และที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 44 (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อโคโนเลต CP4-3, CP5-1 และ CP1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร เชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเรียวยาวอยู่รวมกันเป็นช่อ ประกอบด้วยสปอร์ต่อกันสี่สปอร์ (รูปที่ 5) ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลต คือ CH9-3, CH9-4, CH9-5, CP7-1

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาล ดี-แมนนิทอล ดี-แรมโนม และแอล-แมลทิโอบิโอสได้ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล ดี-ไรโบส กลีเซอรอล และซาลิซิน (ตารางที่ 8)



รูปที่ 5. ก แสดงลักษณะ โคลินีของเชื้อไอโซเลต CH9-5 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

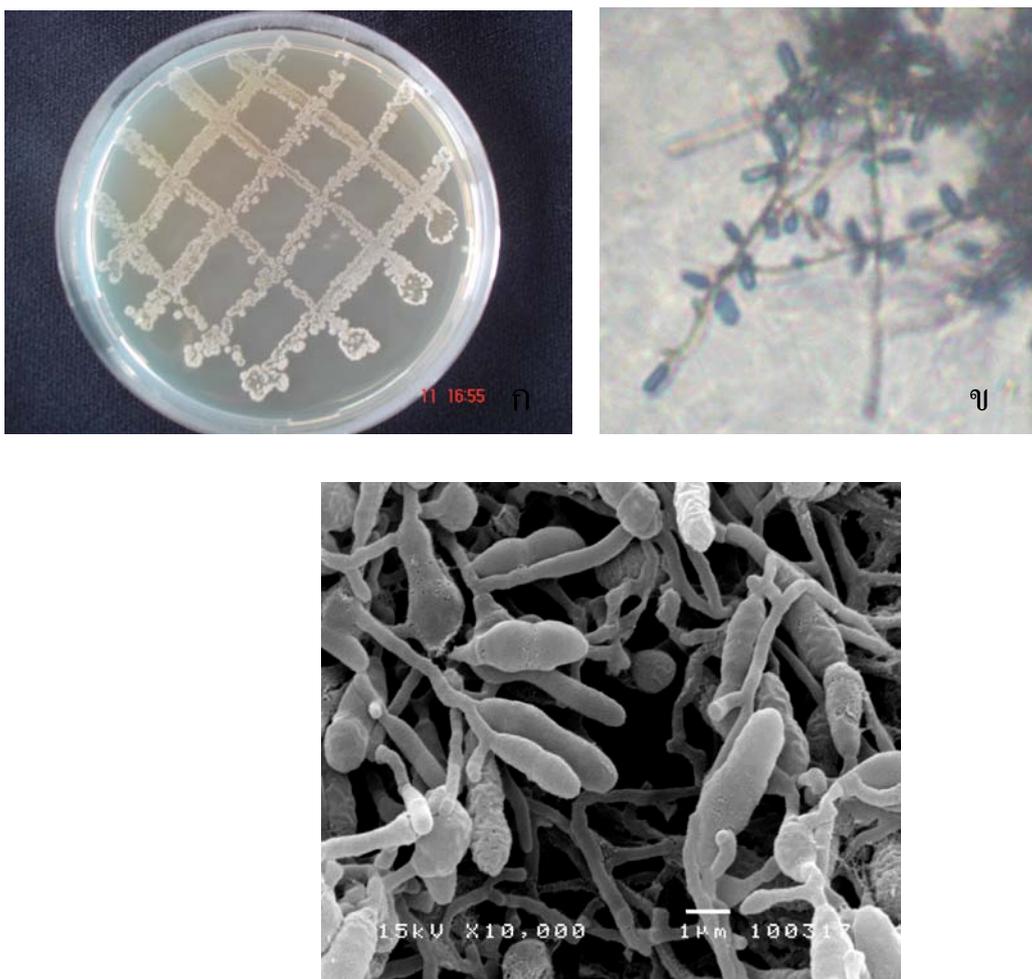
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส กาแลคโตส 3-O-เมทิลแมนโนส (3-O-methylmannose) และ มาคูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planotetraspora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CH9-5

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CH9-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Planotetraspora thailandica* BCC 21825^T (AB370244) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 69 (รูปที่ 8)

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีขาวขุ่น ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร เชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ 4 สปอร์ต่อกันมีลักษณะเป็นท่อนยาวอยู่รวมกันเป็นช่อ (รูปที่ 6) เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 6 ไอโซเลตคือ CP1-2, CP2-9, CP5-2, CP6-2, CP6-5, CP6-6

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 และยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นน้ำตาลดี- ไรโบส แอล-แรมโนส และแมนนิทอล (ตารางที่ 8)



รูปที่ 6. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP1-2 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

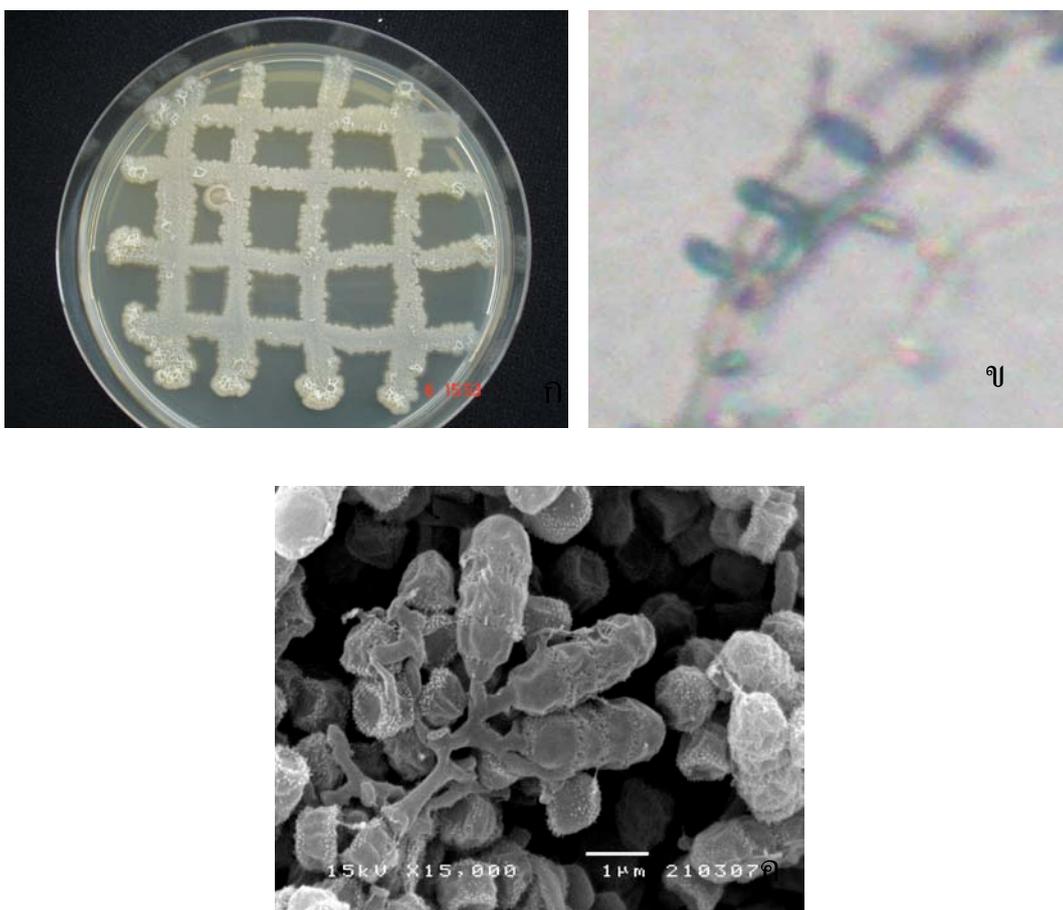
ผนังเซลล์ ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไลอะซีนที่มีลักษณะ *meso* (cell wall type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส กาแลคโตส และ มาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planotetraspora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP1-2

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิตินิมัยสีที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CP1-2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต CP6-3 (ตัวแทนเชื้อกลุ่มที่ 6) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 8) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Planotetraspora thailandica* BCC 21825^T (AB370244) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 (รูปที่ 8)

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลืองไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นท่อนยาวประกอบด้วยสี่สปอร์ต่อกัน (รูปที่ 7) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร YM Gly.A. และ Glu.A. ซึ่งมี 4 ไอโซเลตเดี่ยว คือ CP6-3, CP3-4, CP3-6, CP3-7

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 ในช่วงพีเอช 6 ถึง 8 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม แต่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้เฉพาะน้ำตาล ดี-แมนนิทอลได้ (ตารางที่ 8)



รูปที่ 7. ก แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต CP6-3 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

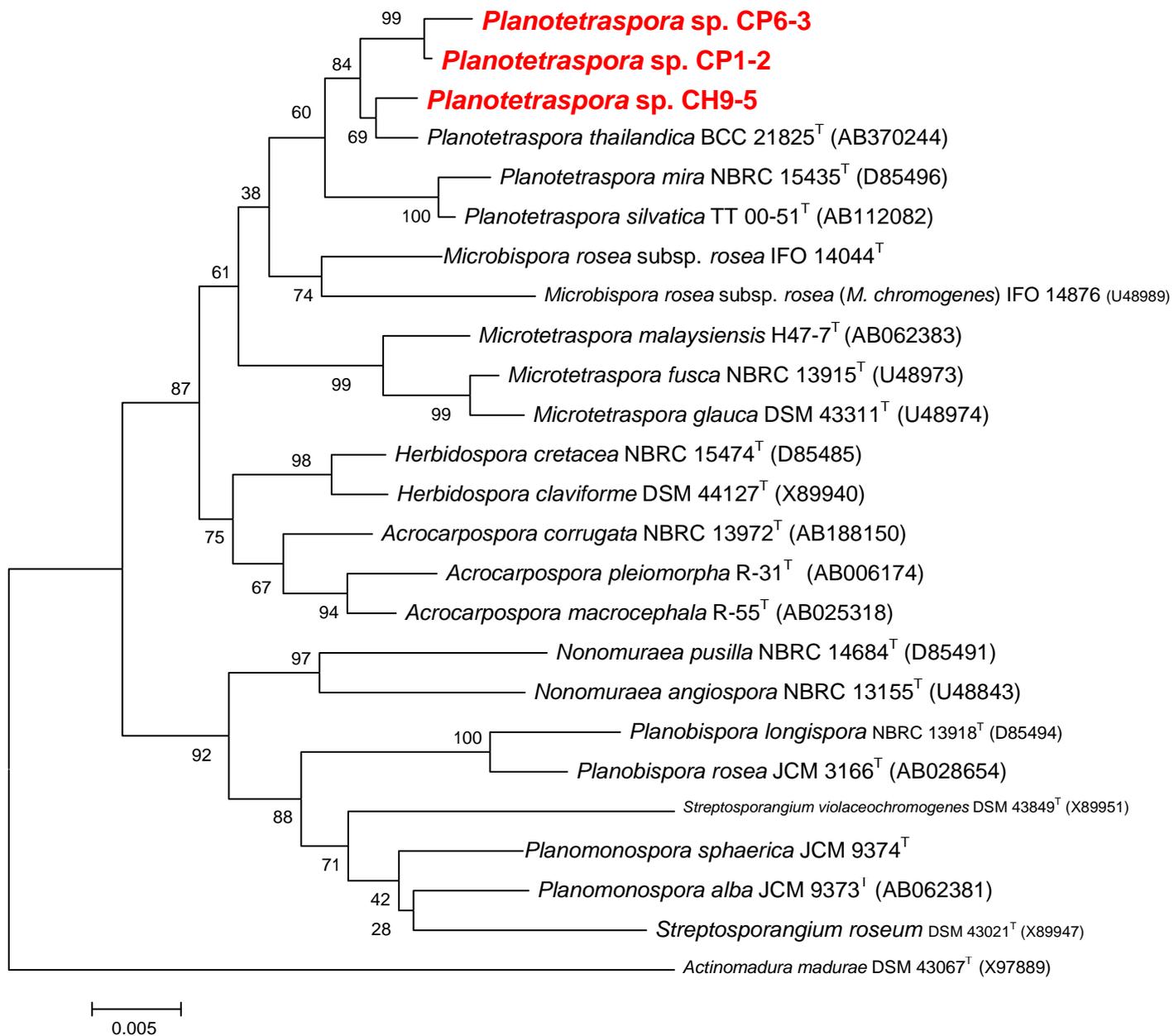
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 6

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* (cell wall type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส กาแลคโตส และ มาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planotetraspora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP6-3

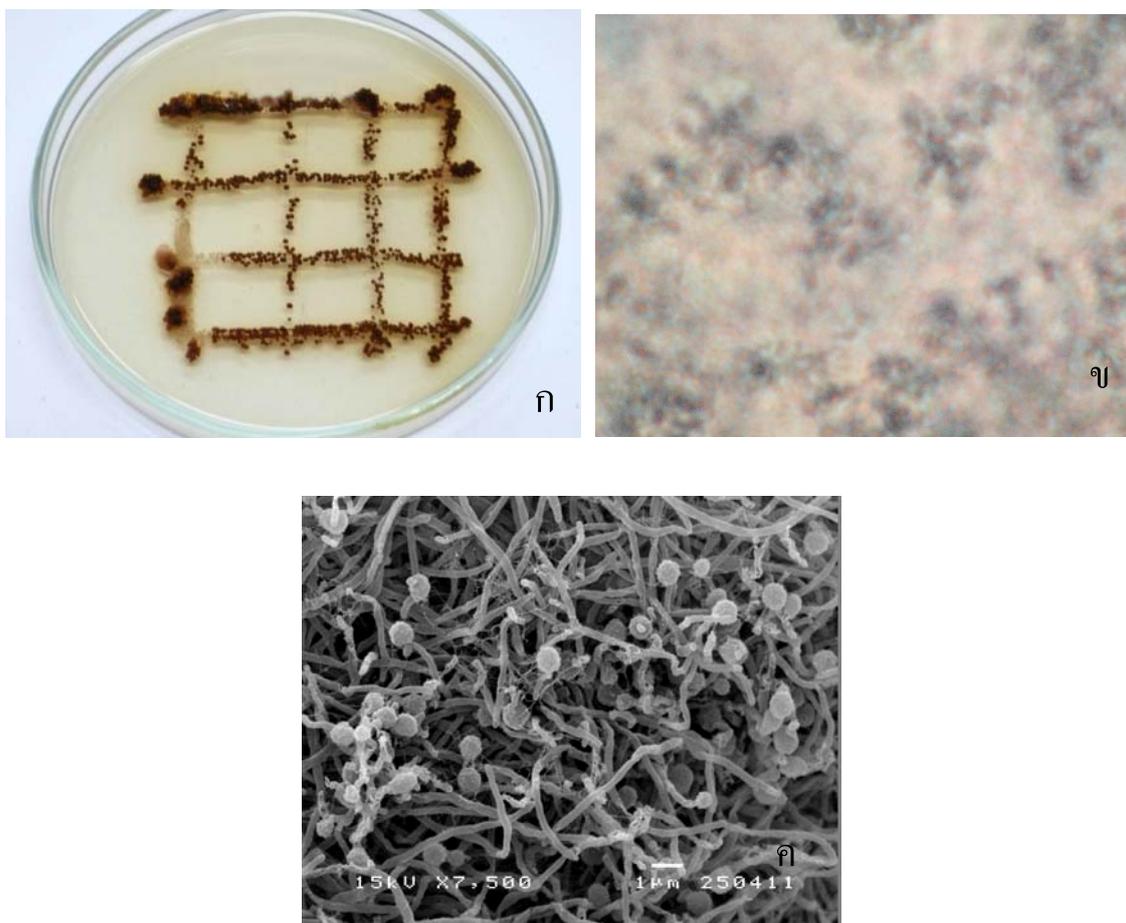
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CP6-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไอโซเลต ย1-2 (ตัวแทนเชื้อกลุ่มที่ 5) มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 8) และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Planotetraspora thailandica* BCC 21825^T (AB370244) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH9-5, CP1-2 และ CP6-3 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัย สิท ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 9) เจริญได้ดีบนอาหาร Y.M. และ O.M. เชื้อในกลุ่มนี้มี 7 ไอโซเลตคือ CP3-5, CP5-4, CP6-4, CP7-5, CP4-1, CP4-6, CP4-7

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 และสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาล เมลลิไบโอสได้ดี แต่ไม่สามารถใช้ ดี-แมนนิทอล กลีเซอรอล ซาลิซิน และ ดี-ไรบูโลสได้ (ตารางที่ 8)



รูปที่ 9. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CP3-5 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 7

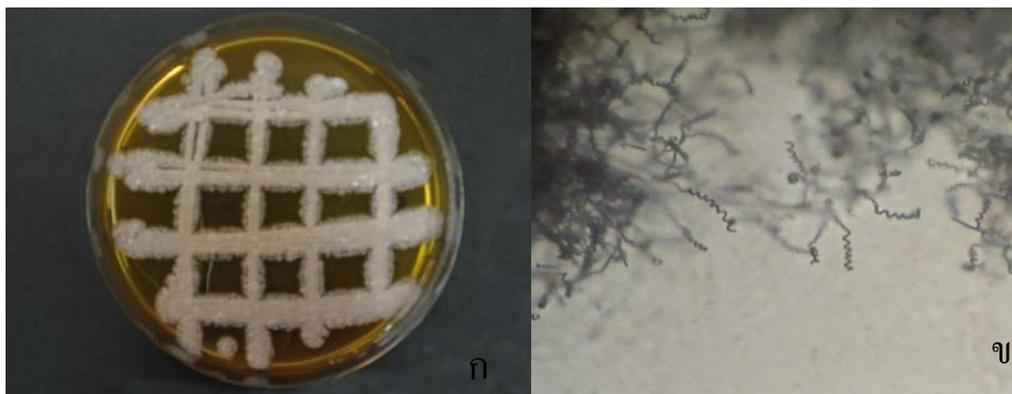
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติลอิโนซิทอล แมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP3-5

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CP3-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora chalcea* DSM 43026^T (X92594) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 67 (รูปที่ 12)

กลุ่มที่ 8 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีส้ม มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองส้มและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบ เกลียว (Spiral type) (รูปที่ 10) เจริญได้ดีบนอาหาร YM และ O.M. เชื้อในกลุ่มนี้มี 6 ไอโซเลตคือ CP1-3, CH9-6, CP5-5, CP5-6, CP1-4, CP1-5

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาลดี-รฟิโนส และ แอล-มิลลิไบโอส (ตารางที่ 8)



รูปที่ 10. ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต CP1-3 บนอาหาร ISP2

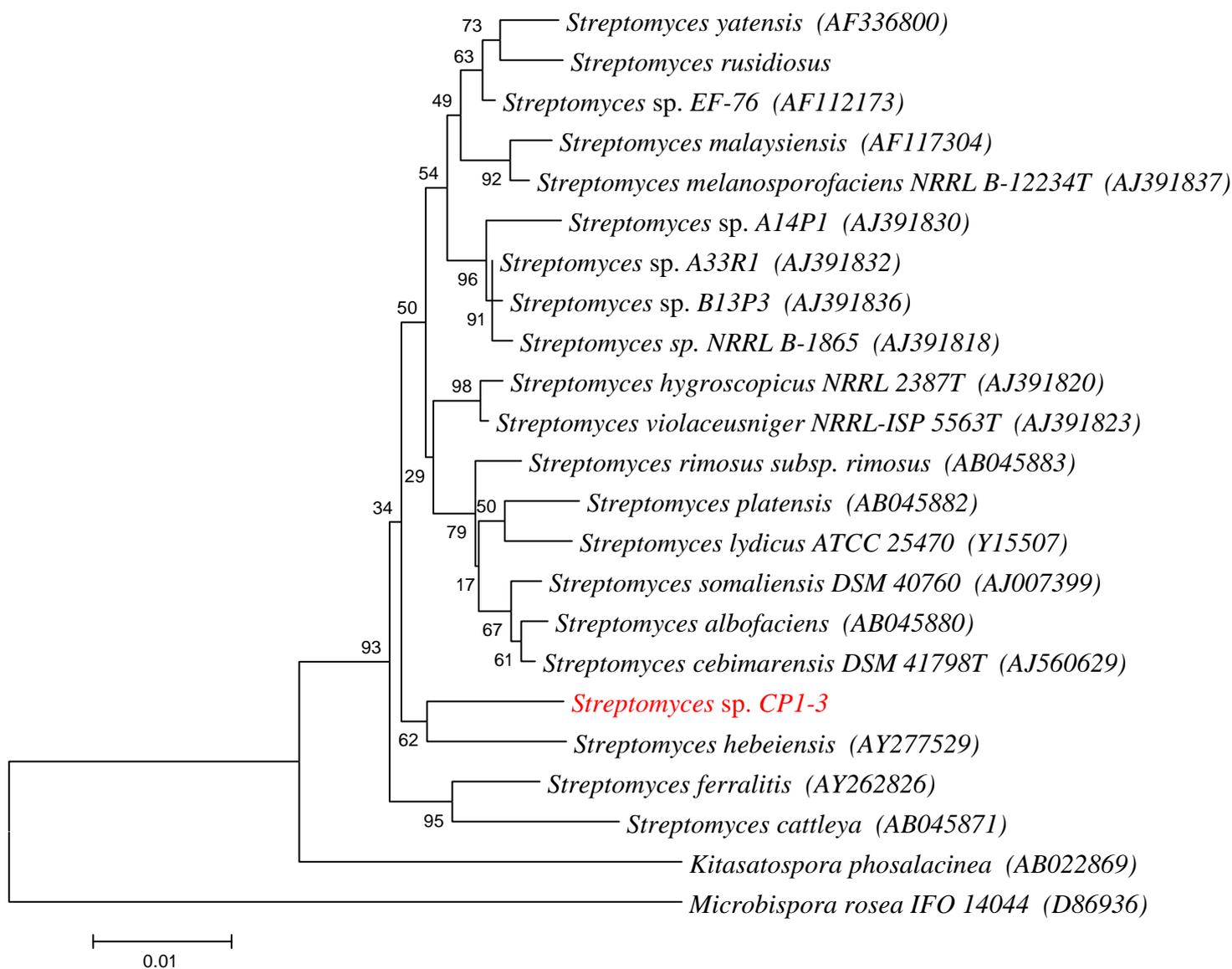
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 8

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิติกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส อะราบีโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.1-71.6 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CP1-3

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TR5-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces hebeiensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 62 (รูปที่ 11)



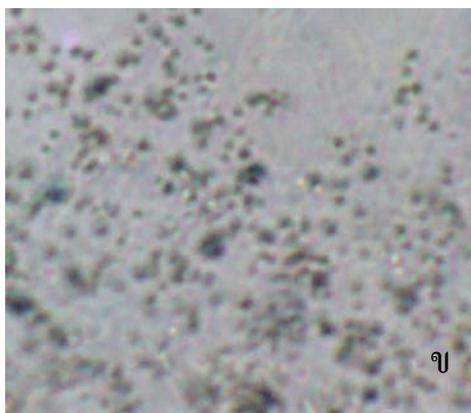
รูปที่ 11 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP1-3 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซิสที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีน้ำตาลเข้ม เชื้อกลุ่มนี้สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 13) เจริญได้ดีบนอาหาร O.M. เชื้อในกลุ่มนี้มี 4 ไอโซเลตคือ CH11-1, CH11-2, CH11-3, CH11-4

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาลแอล-แมลลิไบโอส และแอล-ร็ฟิโนส (ตารางที่ 8)



ก



ข



รูปที่ 12 ก แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อไอโซเลต CH11-1 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

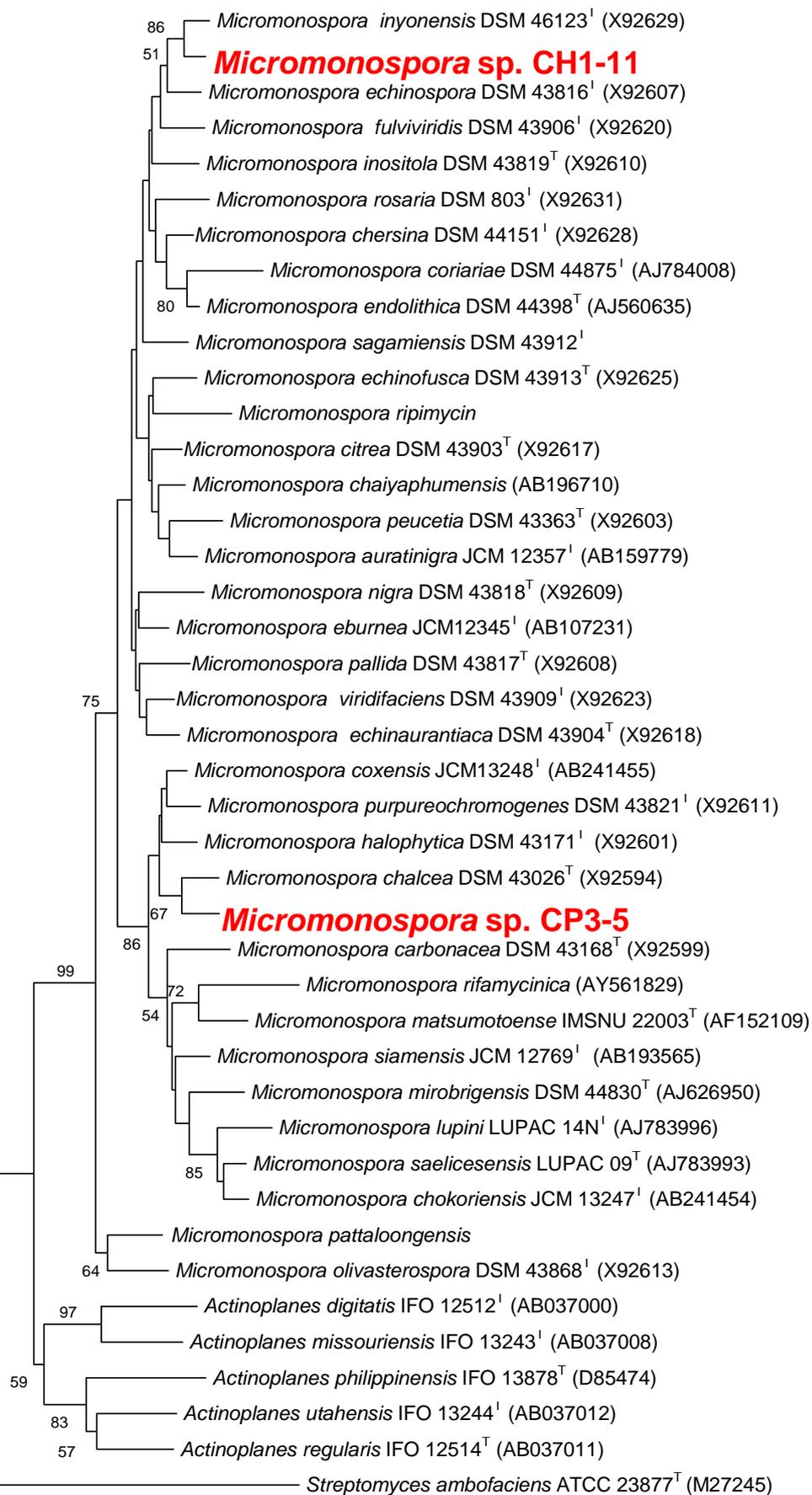
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 9

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CH11-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท์ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อ ไอโซเลต CH11-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora inyonensis* DSM 46123^T (X92629) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 86 (รูปที่ 14)



0.01

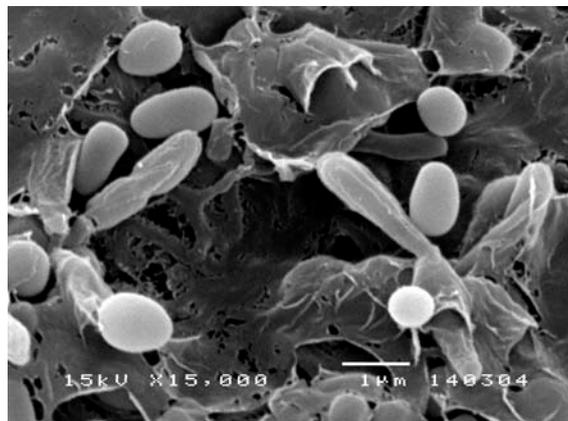
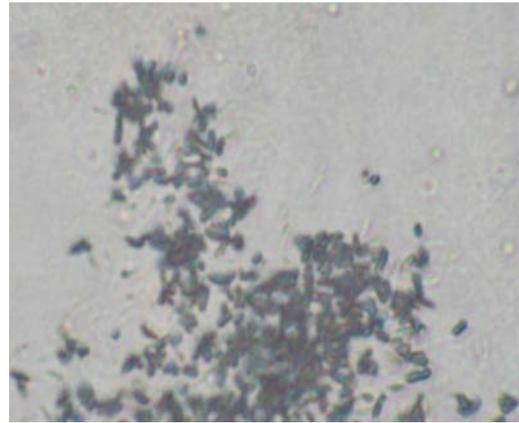
รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP3-5 และ CH11-1 บน phylogenetic tree(NJ method)

กลุ่มที่ 10 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัย สิท ที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์แรงเฉื่อยรูปร่างคล้ายกระบอง ภายในบรรจุด้วยสปอร์ลักษณะกลมรี (รูปที่ 15) ประกอบด้วยสมาชิก 5 ไอโซเลตคือ CH8-5, CH8-9, CH8-10, CP3-8, CP7-4

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิดคือดี- แมนนิทอล ดี- แรมโนส แอล- ราไฟโนส และกลีเซอรอล แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซาลิซินได้ (ตารางที่ 8)



ก



รูปที่ 14 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CH8-5 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

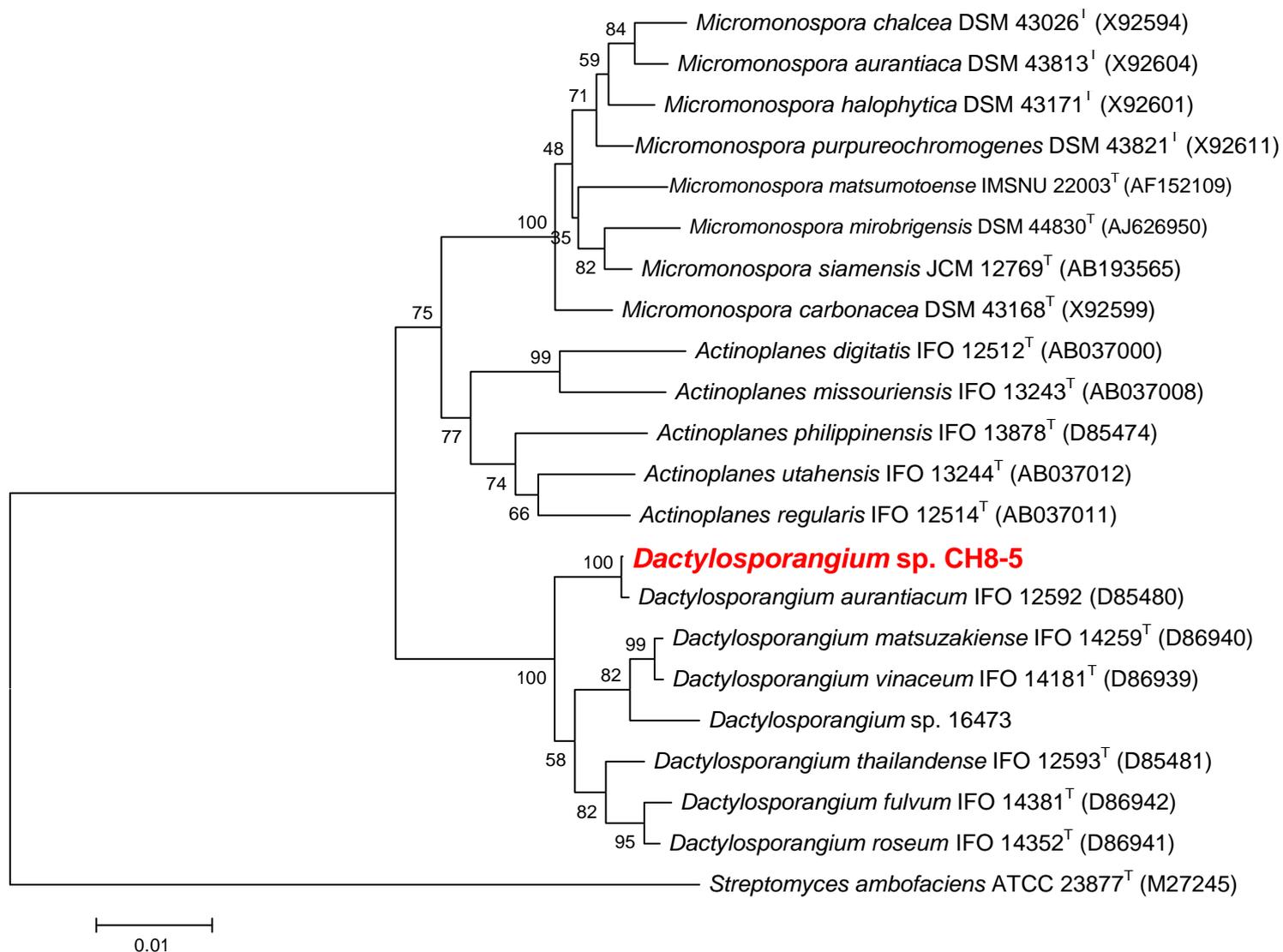
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 10

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* และ 3-hydroxy-*meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แรมโนส อะราบิโนส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Dactylosporangium*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CH8-5

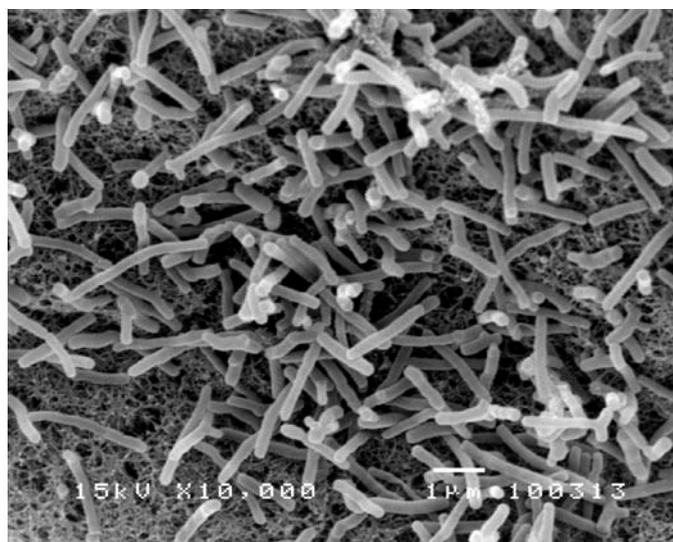
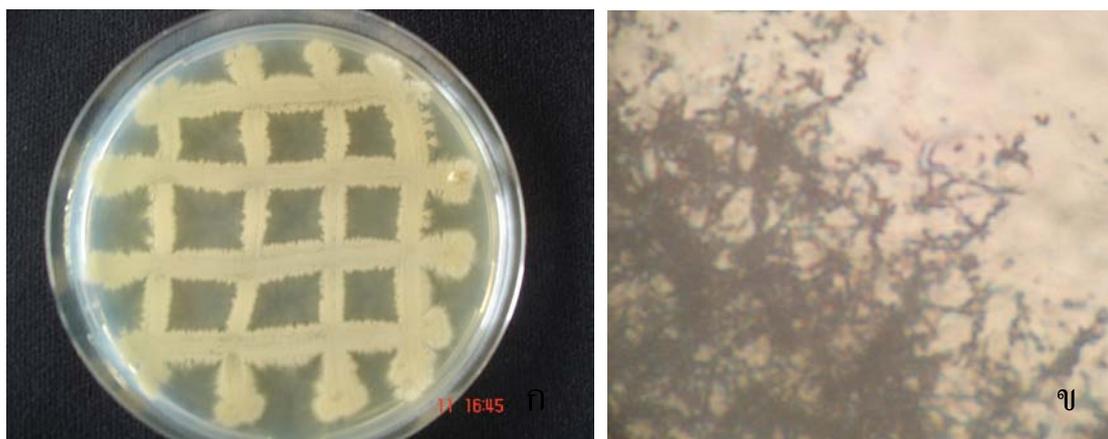
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CH8-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Dactylosporangium aurantiacum* IFO 12592 (D85480) ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 (รูปที่ 16)



รูปที่ 15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH8-5 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 11 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุในอาหาร เส้นใยมีลักษณะเป็นท่อนสั้น (รูปที่ 17) เจริญได้ดีบนอาหาร Y.M. แต่สร้างเส้นใยอากาศบนอาหาร soil extract agar ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลตคือ CH10-9

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 6 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถรีดิว ซันเตรตเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 7) สามารถใช้ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ดี-ฟรุกโตส (ตารางที่ 8)



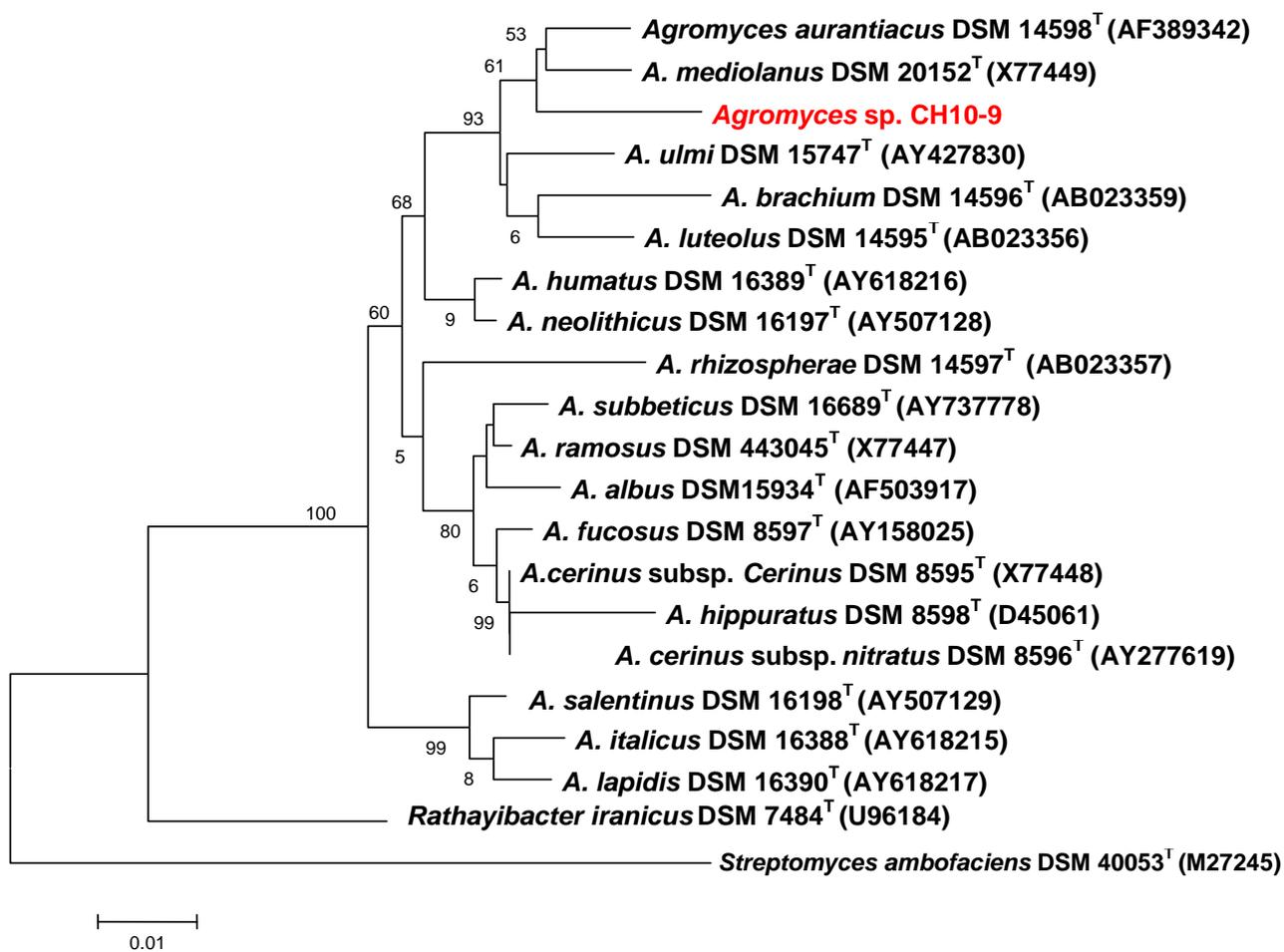
รูปที่ 16 ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต CH10-9 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 11

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนบิวไทริก (peptidoglycan type B2γ) พบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และ ไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบ ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และไกลโคไลปิด เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ พบมีนาควิโนน (menaquinone) ชนิด MK-12 และ MK-13 มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) เท่ากับ 72.71 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Agromyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CH10-9 และ % Homology

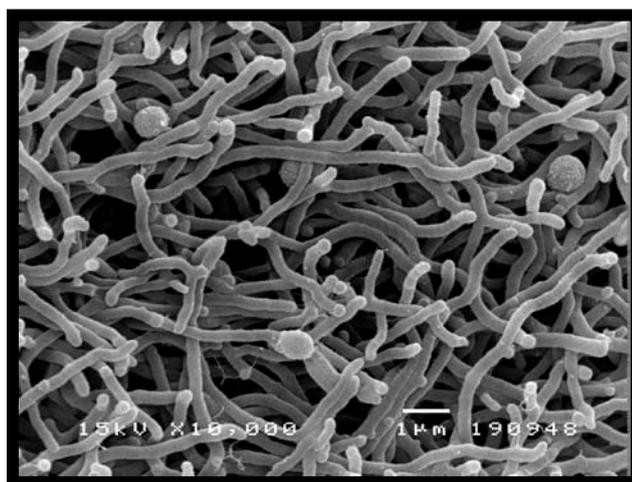
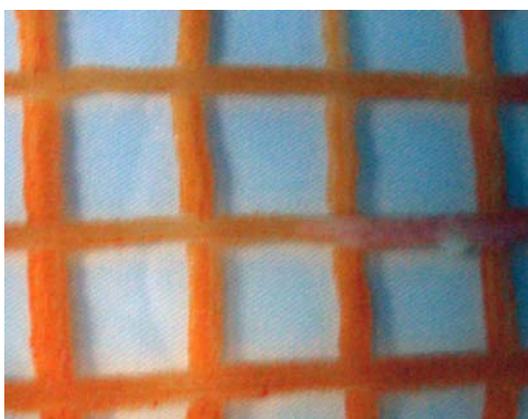
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกคิโนมัยซีที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อ ไอโซเลต CH10-9 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Agromyces aurantiacus* DSM 14598^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 97.1 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 67 (รูปที่ 18) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต CH10-9 และเชื้อ type strain ของสกุล *Agromyces* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Agromyces aurantiacus* JCM 12113^T, *A. mediolanus* JCM 3346^T, *A. ulmi* JCM 13315^T, *A. brachium* JCM 11433^T และ *A. luteolus* JCM 11431) มีค่าเท่ากับ 28.9 25.4 24.1 25.2 และ 19.9 % ตามลำดับ



รูปที่ 17 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CH10-9 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 12 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสี ส้มอมแดงเข้ม สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีเหลือง จางบนอาหาร YM เชื้อกลุ่มนี้สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 19) เจริญได้ดีบนอาหาร YM และ O.M. เชื้อในกลุ่มนี้มี 2 ไอโซเลตคือ CM2-8, CM2-12

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1.5 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายนมและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ (ตารางที่ 7) การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อในกลุ่มนี้พบว่าสามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาล ดี-เมลิไบโอส ดี-ฟรุกโตส ดี-กาแลคโตส แอล-แรมโนส ดี-กลูโคส แลคโตส ดี-ไซโลส เซลลูโลส ไม่ใช้น้ำตาลดี-แมนนิทอล ดี-โรโบส ดี-แรฟไฟโนส กลีเซอรอล ซาลิซิน และดี-อะราบีโนส (ตารางที่ 8)



รูปที่ 18 ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต CM2-8 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

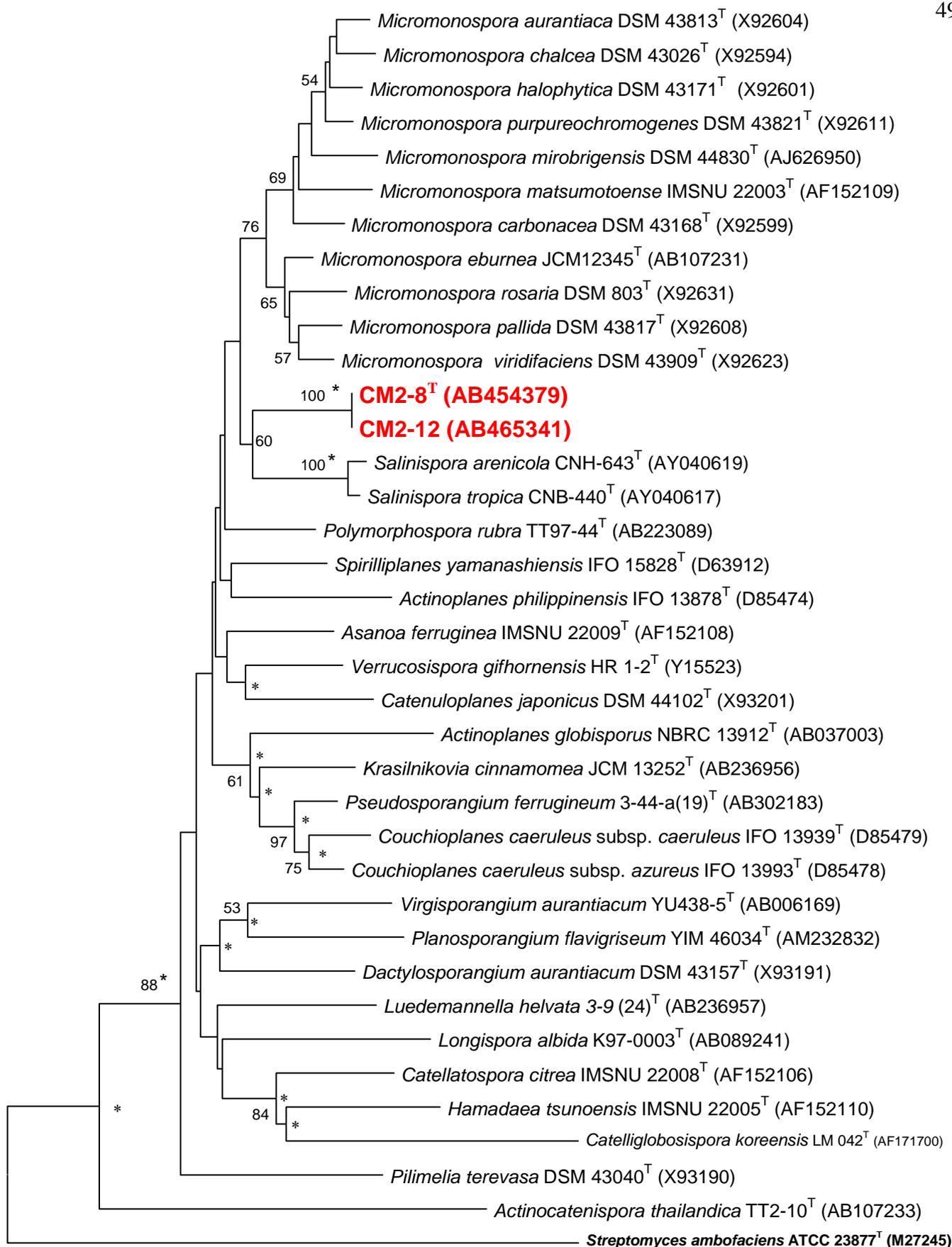
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 12

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก ไกลซีน อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิดิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไฮโลส แมนโนส กาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟทีดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล แมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) พบมีนาควิโนน (menaquinone) ชนิด **MK-9(H₈)**, **MK-10(H₈)**, MK-10(H₈), MK-10(H₄), MK-9(H₄), และ MK-9(H₈) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) เท่ากับ 72.6 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มนี้คล้ายกับเชื้อในวงศ์ *Micromonosporaceae*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CM2-8 และ % Homology

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี พบว่าเชื้อไอโซเลต CM2-8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora eburnea* JCM 12345^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 97.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 60 (รูปที่ 20)



0.01

รูปที่ 19 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CM2-8 บน phylogenetic tree (NJ method)

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP4-3	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CP2-8	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	
P.I.A.	-	-	-		

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH8-1	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CH8-2	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH8-3	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CP7-2	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองอมส้มเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP5-1	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มอมแดงเข้ม	ส้มอมแดงเข้ม	-	
CP6-1	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้ม	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มอมแดงเข้ม	ส้มอมแดงเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP2-11	Y.M.	ดี	สีมอมแดงสว่าง	สีมอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	สีมอมแดงเข้ม	สีมอมแดงเข้ม	-	
CH8-4	Y.M.	ดี	สีมอมแดงสว่าง	สีมอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด (Vivid)	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองส้ม	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	สีมอมแดงเข้ม	สีมอมแดงเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และถิ่นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP4-8	Y.M.	ดี	สีมอมแดงสว่าง ชมพูอ่อน	สีมอมแดงสว่าง เหลืองสด	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	สีมอมแดงเข้ม	สีมอมแดงเข้ม	-	
CP4-9	Y.M.	ดี	สีมอมแดงสว่าง	สีมอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้ม	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	สีมอมแดงเข้ม	สีมอมแดงเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิตินอมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP5-3	Y.M.	ดี	ส้มอมแดงสว่าง	ส้มอมแดงสว่าง	-
	O.M.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองสด	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมส้ม	-
	T.A.	น้อย	เหลืองอมเทา	เหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	เหลืองอมขาว	เหลืองอมขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มอมแดงเข้ม	ส้มอมแดงเข้ม	-	
CP1-1	Y.M.	ดี	น้ำตาลมืด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP3-9	Y.M.	ดี	น้ำตาลมึด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CP7-6	Y.M.	ดี	น้ำตาลมึด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP2-7	Y.M.	ดี	น้ำตาลมึด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CP2-10	Y.M.	ดี	น้ำตาลมึด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และถิ่นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP7-3	Y.M.	ดี	น้ำตาลมึด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CH9-5	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH9-3	Y.M.	ดี	น้ำตาลมืด	น้ำตาลปานกลาง	เหลืองอมส้มสด
	O.M.	ดี	น้ำตาลคล้ำ	เหลืองอมส้มเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ดี	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ดี	เหลืองอมส้มเข้ม	เหลืองเข้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	
CH9-4	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP7-1	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-	
CP1-2	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP2-9	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
CP5-2	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP6-2	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	
CP6-5	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	
CP6-6	Y.M.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	O.M.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	ขาว	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP6-3	Y.M.	ดี	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	-
	O.M.	-	-	-	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Gly.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Glu.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	
CP3-4	Y.M.	ดี	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	-
	O.M.	-	-	-	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Gly.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Glu.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP3-6	Y.M.	ดี	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	-
	O.M.	-	-	-	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Gly.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Glu.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	
CP3-7	Y.M.	ดี	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	-
	O.M.	-	-	-	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Gly.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Glu.A.	ดี	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	Cz.sucrose	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
P.I.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP3-5	Y.M.	ดี	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	
CP5-4	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP6-4	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	
CP7-5	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และถิ่นฐานวิถายของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP4-1	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	
CP4-6	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP4-7	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม	เหลืองส้มคล้ำ	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	เหลืองส้มคล้ำ	เหลืองส้มคล้ำ	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำตาลอมเหลืองเทา	น้ำตาลอมเหลืองเทา	-
	N.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
	P.I.A.	น้อย	ส้มเข้ม	ส้มเข้ม	-
CP1-3	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
	P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH9-6	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	
CP5-5	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP5-6	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	
CP1-4	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP1-5	Y.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	O.M.	ดี	เหลืองส้มเข้ม	เหลืองส้มเข้ม	-
	I.S.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	T.A.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	น้ำตาลอมแดงเข้ม	ส้มอมแดง	-
P.I.A.	ดี	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	
CP4-8	Y.M.	ดีมาก	ดำ	ดำ	-
	O.M.	ดี	ดำ	ดำ	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	ปานกลาง	น้ำตาลเหลืองอมเทา	น้ำตาลเหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทาสว่าง	น้ำตาลเหลืองอมเทาสว่าง	-
	Glu.A.	ดี	ดำ	ดำ	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ดี	ดำ	เหลืองส้ม	-
P.I.A.	ปานกลาง	น้ำตาลเหลืองอมเทา	น้ำตาลเหลืองอมเทา	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP4-9	Y.M.	ดีมาก	ดำ	ดำ	-
	O.M.	ดี	ดำ	ดำ	-
	I.S.	น้อย	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	T.A.	ปานกลาง	น้ำตาลเหลืองอมเทา	น้ำตาลเหลืองอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทาสว่าง	น้ำตาลเหลืองอมเทาสว่าง	-
	Glu.A.	ดี	ดำ	ดำ	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	ดี	ดำ	เหลืองส้ม	-
P.I.A.	ปานกลาง	น้ำตาลเหลืองอมเทา	น้ำตาลเหลืองอมเทา	-	
CP1-5	Y.M.	ปานกลาง	เหลืองส้มสด	เหลืองจาง	-
	O.M.	ปานกลาง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	-
	I.S.	ดี	เหลืองส้มสว่าง	เหลืองส้มสว่าง	-
	T.A.	ดี	เหลืองส้มสว่าง	เหลืองส้มสว่าง	-
	Gly.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้มอ่อน	เหลืองอมส้มอ่อน	-
	Glu.A.	-	-	-	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ไม่มีสี	ไม่มีสี	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองอมส้ม	เหลืองอมส้ม	-
P.I.A.	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอสกีโทไมซีตบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH11-1	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลอมแดงเข้ม
	O.M.	ดี	แดงอมม่วงคล้ำ	แดงอมม่วงคล้ำ	-
	I.S.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทา	ม่วงอมแดงคล้ำ	-
	Gly.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินอมม่วงเข้ม
	Glu.A.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินเข้ม
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินสด
	N.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม
P.I.A.	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	
CH11-2	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลอมแดงเข้ม
	O.M.	ดี	แดงอมม่วงคล้ำ	แดงอมม่วงคล้ำ	-
	I.S.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทา	ม่วงอมแดงคล้ำ	-
	Gly.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินอมม่วงเข้ม
	Glu.A.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินเข้ม
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินสด
	N.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม
P.I.A.	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอสกีโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH11-3	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลอมแดงเข้ม
	O.M.	ดี	แดงอมม่วงคล้ำ	แดงอมม่วงคล้ำ	-
	I.S.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทา	ม่วงอมแดงคล้ำ	-
	Gly.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินอมม่วงเข้ม
	Glu.A.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินเข้ม
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินสด
	N.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม
P.I.A.	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	
CH11-4	Y.M.	ปานกลาง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลอมแดงเข้ม
	O.M.	ดี	แดงอมม่วงคล้ำ	แดงอมม่วงคล้ำ	-
	I.S.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลเหลืองอมเทา	ม่วงอมแดงคล้ำ	-
	Gly.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินอมม่วงเข้ม
	Glu.A.	ปานกลาง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	น้ำเงินเข้ม
	Cz.sucrose	ปานกลาง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินอมม่วง	น้ำเงินสด
	N.A.	น้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม
P.I.A.	น้อย	เหลืองอมส้มสว่าง	เหลืองอมส้มสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH8-5	Y.M.	ปานกลาง	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	O.M.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	I.S.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสว่าง	ชมพูอมเหลืองสว่าง	-	
CH8-9	Y.M.	ปานกลาง	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	O.M.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	I.S.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสว่าง	ชมพูอมเหลืองสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CH8-10	Y.M.	ปานกลาง	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	O.M.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	I.S.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสว่าง	ชมพูอมเหลืองสว่าง	-	
CP3-8	Y.M.	ปานกลาง	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	O.M.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	I.S.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสว่าง	ชมพูอมเหลืองสว่าง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์บนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CP7-4	Y.M.	ปานกลาง	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	O.M.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	I.S.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองอ่อน	ชมพูอมเหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
	N.A.	น้อย	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	-
P.I.A.	น้อย	ชมพูอมเหลืองสว่าง	ชมพูอมเหลืองสว่าง	-	
CH10-9	Y.M.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	O.M.	ปานกลาง	เหลือง	เหลือง	-
	I.S.	น้อย	เหลือง	เหลือง	-
	T.A.	น้อย	เหลือง	เหลือง	-
	Gly.A.	น้อย	เหลือง	เหลือง	-
	Glu.A.	น้อย	เหลือง	เหลือง	-
	Cz.sucrose	ดี	เหลือง	เหลือง	-
	N.A.	ดี	เหลือง	เหลือง	-
P.I.A.	ปานกลาง	เหลือง	เหลือง	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอสกีโทไมซีที่ทนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CM2-8	Y.M.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	Pale yellow
	O.M.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Gly.A.	น้อย	-	ส้ม	-
	Glu.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	-	ส้มจาง	-
	N.A.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-
P.I.A.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-	
	Y.M.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	Pale yellow
	O.M.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
CM2-12	Gly.A.	น้อย	-	ส้ม	-
	Glu.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	-	ส้มจาง	-
	N.A.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-
	P.I.A.	ดี	-	สีส้มอมแดงเข้ม	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัคัสในแต่ละไอโซเลต

กลุ่มที่	รหัสชื่อ	ความเข้มข้นของกลีโค (เปอร์เซ็นต์)							ฟิเอร์					อุณหภูมิจึง (องศาเซลเซียส)					Skim milk		การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรท	การย่อยสลายแป้ง	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation									
1	CP4-3	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CP2-8	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CH8-1	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH8-2	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH8-3	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP7-2	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	CP5-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	CP6-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	CP2-11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	CH8-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+++	+	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	CP4-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	CP4-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	CP5-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
3	CP1-1	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	CP3-9	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	CP7-6	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CP2-7	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CP2-10	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CP7-3	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	CH9-5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH9-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH9-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP7-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	CP1-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	CP2-9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	CP5-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	CP6-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP6-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP6-6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ) 81

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของกลีโค (เปอร์เซ็นต์)							ฟิโอส					อุณหภูมิจึง (องศาเซลเซียส)					Skim milk		การย่อยสลาย เตลาคีน	การรีดิวซ์ ไนเตรท	การย่อยสลาย แก๊ส	จุดเริ่มต้นเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบ				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	8	20	37	40	45	50	Peptoniz ation	Coagul ation								
6	CP6-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP3-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP3-6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP3-7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7	CP3-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP5-4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP6-4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP7-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP4-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP4-6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CP4-7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
8	CP1-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CH9-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP5-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP5-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP1-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CP1-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9	CH11-1	+	-	-	-	-	-	-	-	W	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	CH11-2	+	-	-	-	-	-	-	-	W	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	CH11-3	+	-	-	-	-	-	-	-	W	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	CH11-4	+	-	-	-	-	-	-	-	W	W	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	CH8-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	++	+	W	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH8-9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	++	+	W	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CH8-10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	++	+	W	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP3-8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	++	+	W	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP7-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	W	++	+	W	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	CH10-9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	+	-
12	CM2-8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	-	-
	CM2-12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	-	-

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

จากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกทั้ง 57 ไอโซเลต เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* จำนวน 23 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จำนวน 16 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จำนวน 19 ไอโซเลต และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* จำนวน 6 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต
ด้วยวิธี Agar disc diffusion

กลุ่มที่	รหัสชื่อ	บริเวณการยับยั้ง (ม.ม.) (50 mg/ml)					
		<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	CP4-3	-	-	-	-	-	-
	CP2-8	-	-	-	-	-	-
	CH8-1	-	-	-	-	-	-
	CH8-2	-	-	-	-	-	-
	CH8-3	-	-	-	-	-	-
	CP7-2	-	-	-	-	-	-
2	CP5-1	-	-	-	-	-	-
	CP6-1	-	-	-	-	-	-
	CP2-11	-	-	-	-	-	-
	CH8-4	-	-	-	-	-	-
	CP4-8	-	-	-	-	-	-
	CP4-9	-	-	-	-	-	-
	CP5-3	-	-	-	-	-	-
3	CP1-1	-	9	11.5	8	-	-
	CP3-9	-	9	11	7.5	-	-
	CP7-6	-	10	11	8.5	-	-
	CP2-7	-	10.5	9.5	7.5	-	-
	CP2-10	-	8	10.5	8	-	-
	CP7-3	-	9.5	10.5	8	-	-
4	CH9-5	-	7.5	8	-	-	-
	CH9-3	-	7	7.5	-	-	-
	CH9-4	-	8.5	7.5	-	-	-
	CP7-1	-	8	8	-	-	-

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต
ด้วยวิธี Agar disc diffusion (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (ม.ม.) (50 mg/ml)					
		<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
5	CP1-2	-	-	-	-	-	-
	CP2-9	-	-	-	-	-	-
	CP5-2	-	-	-	-	-	-
	CP6-2	-	-	-	-	-	-
	CP6-5	-	-	-	-	-	-
	CP6-6	-	-	-	-	-	-
6	CP6-3	-	-	-	-	-	-
	CP3-4	-	-	-	-	-	-
	CP3-6	-	-	-	-	-	-
	CP3-7	-	-	-	-	-	-
7	CP3-5	-	8	-	7.0	-	-
	CP5-4	-	8	-	7.5	-	-
	CP6-4	-	8.5	-	7.5	-	-
	CP7-5	-	9.0	-	8.0	-	-
	CP4-1	-	8.5	-	8.0	-	-
	CP4-6	-	8	-	7.0	-	-
	CP4-7	-	9.0	-	7.0	-	-
8	CP1-3	-	10.5	7.5	14.5	9.0	-
	CH9-6	-	12	9.0	13.0	8.5	-
	CP5-5	-	11.5	9.0	16.5	8.0	-
	CP5-6	-	1.5	8.5	15.5	9.0	-
	CP1-4	-	10.5	8.5	15.5	9.0	-
	CP1-5	-	11.5	9.0	12.5	8.5	-

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต
ด้วยวิธี Agar disc diffusion (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสชื่อ	บริเวณการยับยั้ง (ม.ม.) (50 mg/ml)					
		<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
9	CH11-1	-	14.5	12.0	-	-	-
	CH11-2	-	15.5	11.5	-	-	-
	CH11-3	-	17.5	12.0	-	-	-
	CH11-4	-	16.0	13.5	-	-	-
10	CH8-5	-	10.5	-	-	-	-
	CH8-9	-	11.0	-	-	-	-
	CH8-10	-	11.5	-	-	-	-
	CP3-8	-	9.5	-	-	-	-
	CP7-4	-	9.0	-	-	-	-
11	CH10-9	-	-	-	-	-	-
12	CM2-8	-	8.0	7.5	-	-	-
	CM2-12	-	7.0	7.0	-	-	-

4.3 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่คัดเลือก คือ ไอโซเลต CP1-3 ในอาหารเหลว yeast extract malt extract ปริมาณ 20 ลิตร เป็นเวลา 14 วัน และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตตได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต 1.56 กรัม นำสารสกัดหยาบมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เซฟาเด็กซ์ แอล เฮช 20 ในตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกต่อด้วย ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 11 ต่อ 1 ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ให้รหัสเป็น CP1-3-001

สาร CP1-3-001 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESI-TOF mass ปรากฏ pseudomolecular ion peak ที่ m/z 1255 $(M+H)^+$ ซึ่งสามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ สารนี้ให้ UV spectrum (in MeOH) ที่ λ_{max} (log ϵ) ที่ 240 (4.35) และ 442 (4.20) nm สารนี้แสดงหมู่ amide carbonyl (ν_{max} 1636 cm^{-1}) และ lactone carbonyl (ν_{max} 1751 cm^{-1}) และมี optical rotation $[\alpha]_D^{25}$ -181.7° ($c = 0.132$ in MeOH) เมื่อนำสาร CP1-3-001 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 1H และ ^{13}C NMR ได้ข้อมูลที่มีลักษณะคล้ายสาร actinomycin D ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 9 ^1H และ ^{13}C NMR spectral (in CDCl_3) of CP1-3-001 และ actinomycin D

	Position	CP1-3-001		Actinomycin D (in CDCl_3)	
		d_c (ppm)	d_H (ppm), mult, (J in Hz)	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^a	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^b
Sar	1	165.83/166.07	-	-	-
(1,2)	2	51.40/51.44	3.61, 1H, d (18.31)	3.63 (17.8)	3.61 (18)
			4.69, 1H, d (18.31)	4.79 (17.8)	4.73 (18)
			3.59, 1H, d (18.31)	3.63 (17.8)	3.62 (18)
			4.76, 1H, d (18.13)	4.72 (17.8)	4.79 (18)
	N-CH ₃	34.92/34.98	2.85, 6H, s	2.89/2.94	2.87
MeVal	1	167.32/167.41	-	-	-
(1,2)	2	71.27/71.43	2.64, 2H, m	6.03 (7.5)/5.95 (7.5)	2.67, m
	3	26.96	2.64, 2H, m	2.60-2.75	2.67, m
	3-Me	21.70/21.80	0.92, 3H, d (5.64)	0.96	0.95 (5.3)
			0.94, 3H, d (5.25)		
	4	19.37/19.42	0.71, 6H, d (5.06)	0.76	0.74 (5.2)
	N-CH ₃	39.27	2.87, 3H, s	2.89	2.88
		39.38	2.87, 3H, s		2.93
Val	1	173.10/173.48	-	-	-
(1,2)	2	58.74/58.91	3.49, 2H, m	3.62	3.53 (5.6), 3.55
	3	31.63/31.91	2.14, 2H, br s	2.2	2.17 (M)
	3-Me	19.22/19.24	0.86, 3H, d (6.79)	0.91(6.5)	0.89 (6.5)
			0.88, 3H, d (6.87)		0.90 (6.5)
	4	19.12-19.18	1.10, 3H, d (6.34)	1.13 (6.5)	1.11 (6.4)
			1.09, 3H, d (6.38)		
	NH	-	8.09, 1H, d (5.85)	8.19 (5.7)	8.10 (5.6)
		-	7.94, 1H, d (6.19)	7.94 (6.0)	7.94 (5.6)

ตารางที่ 9 ^1H และ ^{13}C NMR spectral (in CDCl_3) of CP1-3-001 และ actinomycin D (ต่อ)

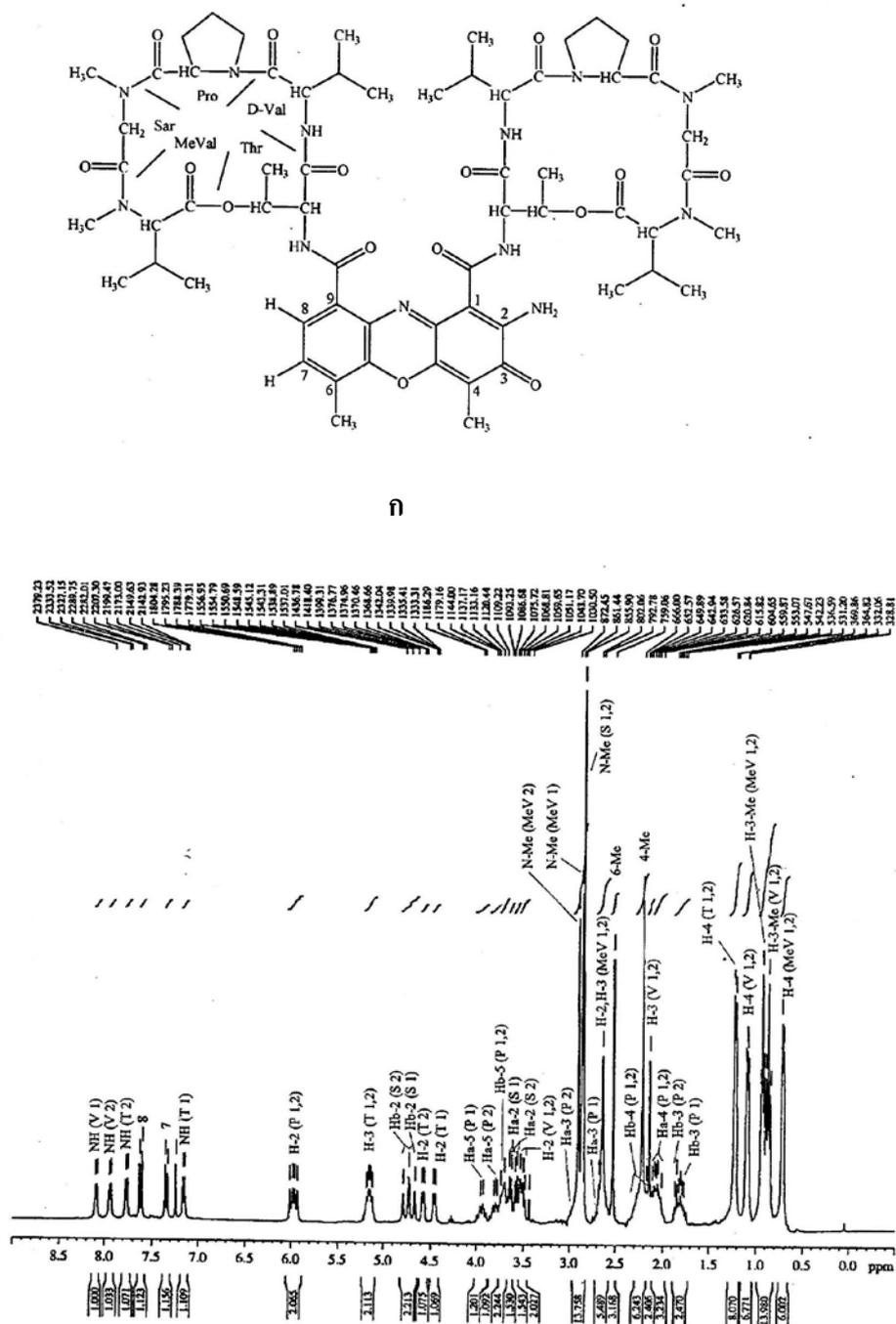
	Position	CP1-3-001		Actinomycin D (in CDCl_3)	
		d_c (ppm)	d_H (ppm), mult, (J in Hz)	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^a	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^b
Pro	1	173.02,2CO	-	-	-
(1,2)	2	56.22/56.38	5.94, 1H, d (9.08)	3.9	5.98 (8.0)
			6.00, 1H, d (9.05)	4	6.03 (8.0)
	3	31.05/31.37	1.79, 1H, m	2.1-2.2	1.7-2.4/2.70, m
			2.67, 1H, m		
			1.84, 1H, m		
			2.95, 1H, m		1.7-2.4/2.90, m
	4	22.98/23.14	2.05, 2H, m	1.85	1.7-2.4
			2.26, 2H, m		
	5	47.38	3.70, 1H, m	3.70-3.75	3.4-4.2
			3.94, 1H, m	2.67	
		47.64	3.70, 1H, m		
			3.80, 1H, m		
Chrom	1	101.59	-	-	-
	2	147.47	-	-	-
	3	178.85	-	-	-
	4	111.38	-	-	-
	4a	145.69	-	-	-
	5a	140.29	-	-	-
	6	127.42	-	-	-
	7	130.1	7.34, 1H, d (7.77)	7.37	7.37 (8.0)
	8	125.72	7.62, 1H, d (7.77)	7.64	7.64 (8.0)
	9	132.48	-	-	-
	9a	128.95	-	-	-
	10a	144.92	-	-	-
	4-CH ₃	7.93	2.22, 3H	2.24	2.27
	6-CH ₃	15.17	2.53, 3H	2.56	2.55
	1-CO/9-CO	166.24/166.28		-	-
	2-NH	-	-	7.3-7.4	7.0-7.5

ตารางที่ 9 ^1H และ ^{13}C NMR spectral (in CDCl_3) of CP1-3-001 และ actinomycin D (ต่อ)

	Position	CP1-3-001		Actinomycin D (in CDCl_3)	
		d_c (ppm)	d_H (ppm), mult, (J in Hz)	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^a	d_H (ppm), mult, (J in Hz) ^b
Thr	1	166.24/166.28	-	-	-
(1,2)	2	54.93	4.46, 1H, dd (6.68, 2.10)	4.51 (2.0-2.5)	4.50, (6.8/2)
		55.3	4.57, 1H, dd (6.34, 1.80)	4.62 (6.5)	4.60, (6.6)
	3	74.97/75.04	5.15, 2H, dq	5.21 (2.0-2.5)/5.15	5.21 (6.1/2), 5.17 (6.1/2)
	4	17.53/17.93	1.22, 6H,d (5.04)	1.27 (6.0)	1.26, (6.2)
	NH	-	7.15, 1H,d (6.68)	7.20 (6.8)	7.21, (6.8)
		-	7.76, 1H, d (6.34)	7.82 (6.2)	7.84, (6.6)

^afrom Arison and Hoogsteen., 1970

^bfrom Lackner, 1971



รูปที่ 20 ก. โครงสร้างทางเคมีของสาร CP1-3-001 (actinomycin D)

ข. ^1H NMR spectrum (300 MHz, in CDCl_3) of CP1-3-001 (actinomycin D)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินป่าพรุในเขตจังหวัดชุมพรและเชียงใหม่ และสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากออกเป็น 12 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์พบว่า

กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Microbispora*

กลุ่มที่ 4, 5 และ 6 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสปอร์แรงเจียที่มีลักษณะเป็นท่อนยาวเห็นรอยคอดของสปอร์แบ่งเป็น 4 ส่วน ภายในบรรจุด้วยสปอร์รูปกลมรีต่อกัน มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Planotetraspora*

กลุ่มที่ 7 และ 9 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 8 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา เส้นใยอาหารสีส้ม มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองส้มและลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 10 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ พบว่ามีสปอร์แรงเจียรูปท่อนลักษณะคล้ายนิ้วมือรวมอยู่กันเป็นช่อ ภายในมีสปอร์รูปร่างรี สามารถเคลื่อนที่ได้ และพบ globose body จำนวนมาก มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Dactylosporangium*

กลุ่มที่ 11 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะเซลล์รูปร่างแท่งตรง มีลักษณะคล้ายเส้นใยเมื่อเลี้ยงบนอาหาร soil extract-yeast extract agar ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไคอะมิโนบิวไทริกเป็นองค์ประกอบหลัก มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Agromyces*

กลุ่มที่ 12 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์มีลักษณะคล้ายเชื้อสกุล *Micromonospora*

จากเชื้อแอคติโนมัยสีทข้างต้น เชื้อ ไอโซเลต CM2-8 และ CM2-12 มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ type strain สกุล *Micromonospora* ในระดับต่ำ (97.9%) เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์อย่างละเอียดสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต นี้เป็นเชื้อสกุลใหม่ในวงศ์ *Micromonosporaceae*

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 57 ไอโซเลต ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า สิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อกลุ่มที่ 3 4 7 8 9 10 และ 12 (40.3% ของเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากทั้งหมด) แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 8 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดพบว่า เชื้อไอโซเลต CP1-3 สร้างสาร Actinomycin D ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบที่ระดับ MIC ในช่วง 15.6-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าดินตัวอย่างจากผืนป่าบริเวณพรมมีความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง ถือว่าเป็นแหล่งของทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- สนิท อักษรแก้ว. 2545. การอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลนระดับนานาชาติ. การสัมมนาระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ ครั้งที่ 12, 28-30 สิงหาคม 2545 ณ โรงแรมทวินโลดส์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ
- Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes*. Japan.
- Canedo, L.M.C., Blanco, J.A., Baz, J.P., Puentes, J.L., Millan, F.R., Vazquez, F.E. and Chimeno, R.I. 2000. 4'-N-Methyl-5'-hydroxystaurosporine, New Indolocarbazole Alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. strain. *J. Antibiotics*. 55: 895-902.
- Carter, G. T., Nietsche, J. A., Williams, D. R., and Borders, D. B. 1990. Citreamicins, novel antibiotics from *Micromonospora citrea*: isolation, characterization, and structure determination. *J. Antibiotics*. 43: 504-512.
- Cascon, L. M., Romero, F., Vazquez, F. E., Gravalos, D., and Puentes, J. L. 2003. IB-00208, a New Cytotoxic Polycyclic Xanthone Produced by a Marine-derived *Actinomadura*. I. Isolation of the Strain, Taxonomy and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 56: 219-225.
- Cevallos, A., and Guerriero, A. 2003. Isolation and Structure of a New Macrolide Antibiotic, Erythromycin G, and a Related Biosynthetic Intermediate from a Culture of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Antibiotics*. 56: 280-288.
- Chimeno, R.I., Canedo, L.M.C., Espliego, F., Gravalos, D., Calle, F.C. and Puentes, J.L.F. 2000. IB-96212 a Novel Cytotoxic Macrolide Produced by a Marine *Micromonospora*. *J. Antibiotics*. 53: 474-478.
- Cho, S. I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T., and Uehara, Y. 2002. Effects of Hibarimicins and Hibarimicin-Related Compounds Produced by *Microbispora* on v-Src Kinase Activity and Growth and Differentiation of Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiotics*. 55: 270-278.
- Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.
- Esumi, Y., Suzuki, Y., Itoh, Y., Uramoto, M., Kimura, K. I., Goto, M., Yoshihama, M., and Ichikawa, T. 2002. Propeptin, a New Inhibitor of Prolyl Endopeptidase Produced by *Microbispora*. II. Determination of Chemical Structure. *J. antibiot*. 55: 296-300.

- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 224-229.
- Ferh, T., Sanglier, J. J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W., and Wioland, C. 1996. Novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. *J. Antibiotics.* 49: 230-234.
- Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N., and Oki, T. 2002. Kosinostatin, a Quinocycline Antibiotic with Antitumor Activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J. Antibiotics.* 55: 128-133.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- Greenwood, R. C., and Gentry, D. R. 2002. Confirmation of the Antibacterial Mode of Action of SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics.* 55: 423-426.
- Harada, K., Tomita, K., Fujii, K., Masuda, K., Mikami, Y., Yazawa, K., and Komaki, H. 2004. Isolation and Structural Characterization of Siderophores, Madurastatins, Produced by a Pathogenic *Actinomadura madurae*. *J. Antibiotics.* 57: 125-135.
- Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Henry, R., Whittern, D. M., and McALPINE, J. 1995. Macquarimicins, Microbial metabolites from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics.* 48: 467-470.
- Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Houge-Frydrych, C., Readshaw, S. A. and BELL, D. J. 2000. SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from a *Micromonospora* sp. II. Structure Determination. *J. Antibiotics.* 53: 351-356.
- Igarashi, Y., Takagi, K., Kan, Y., Fujii, K., Harada, K. I., Furumai, T., and Oki, T. 2000. Arisostatins A and B, New Members of Tetrocarcin Class of Antibiotics from

- Micromonospora* sp. TP-A0316. II. Structure Determination. *J. Antibiotics*. 53: 233-240.
- Ishigami, K., Hayakawa, Y., and Seto, H. 1994. Cororubicin, a new anthracycline antibiotic generating active oxygen in tumor cell. *J. Antibiotics*. 47: 1219-1225.
- Itoh, J., Watabe, H. O., Ishii, S., Gomi, S., Nagasawa., Yamamoto, H., Shomura, T., Sezaki, M., and Kondo, S. 1990. Sibanomicin, a new pyrrolo[1,4]-benzodiazepinen antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 41: 1281-1284.
- Kasai, H., Tamura, T. and Harayama, S. 2000. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gryB*- based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 127-134.
- Kase, H., Kaneko, M., and Yamada, K. 1987. K-13, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Micromonospora halophytica* subsp. *exilis*. *J. Antibiotics*. 40: 450-454.
- Kinoshita, K., Takenaka., Suzuki, H., Morohoshi, T., and Hayashi, M. 1992. Mycinamicins, new macrolide antibiotics XIII. Isolation and structures of novel fermentation products from *Micromonospora griseorubida* (FERM BP-705). *J. Antibiotics*. 45: 1-9.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*. 19: 161-207.
- Kowamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora* In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria, IV. pp.2442-2450. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Laakso, J. A., Mocek, U. M., Dun, J. V., Wouters, W., and Janicot, M. 2003. R176502, a New Bafilolide Metabolite with Potent Antiproliferative Activity from a Novel *Micromonospora* species. *J. Antibiotics*. 56: 909-916.
- Lam, K. S., Hesler, G. A., Gustavson, D. R., Berry, R. L., Tomita, K., MacBeth, J. L., Ross, J., Miller, D., and Forenza, S. 1996. Pyrrolosporin A, a new antitumor antibiotic from *Micromonospora* sp. C39217-R109-7. *J. Antibiotics*. 49: 866-872.

- Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Colson, K. L., Matson, J. A., Rose, W. C., Doyle, T. W., and Forenza, S. 2001. Production, Isolation and Structure Determination of Novel Fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiotics*. 54: 1-9.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E., and Tillequin, F. P. 2002. New Dithiolopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 55: 696-701.
- Leet, J. E., Li, W., Ax, H. A., Matson, J. A., Huang, S., Huang, R., Cantone, J. L., Drexler, D., Dalterio, R. A., and Lam, K. S. 2003. Nocathiacins, New Thiazolyl Peptide Antibiotics from *Nocardia* sp. II. Isolation, Characterization, and Structure Determination. *J. Antibiotics*. 56: 232-242.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. pp. 161-207. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- Lu, C., Bai, L., and Shen, Y. 2004. A Novel Amide N-Glycoside of Ansamitocins from *Actinosynnema pretiosum*. *J. Antibiotics*. 57: 348-350.
- Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H., and Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *J. Antibiotics*. 56: 622-629.
- Matsuda, Y., Asano, K., and Kawamoto, I. 1987. K-259-2, A new inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *J. Antibiotics*. 40: 1092-1100.
- Mikami, Y., Komaki, H., Imai, T., Yazawa, K., Nemoto, A., Tanaka, Y., and Grafe, U. 2000. A New Antifungal Macrolide Component, Brasilinolide B, Produced by *Nocardia brasiliensis*. *J. Antibiotics*. 53: 70-74.
- Momose, I., Sekizawa, R., Hashizume, H., Kinoshita, N., Homma, Y., Hamada, M., Inuma, H., and Takeuchi, T. 2001. Tyropeptins A and B, New Proteasome Inhibitors Produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Taxonomy, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities. *J. Antibiotics*. 54: 997-1003.

- Moon, S. S., Hwang, W. H., Chung, Y. R., and Shin, J. 2003. New Cytotoxic Bafilomycin C1-amide Produced by *Kitasatospora cheerisanensis*. *J. Antibiotics*. 56: 856-861.
- Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-ya, K., Shiozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H., and Hayakawa, Y. 2001. Ammocidin, a New Apoptosis Inducer in Ras-dependent Cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiotics*. 54: 710-717.
- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K.I. and Kudo, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. . *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1761-1767.
- Nemoto, A., Hoshino, Y., Yazawa, K., Ando, A., Mikami, Y., Komaki, H., Tanaka, Y., and Grafe, U. 2000. Asterobactin, a New Siderophore Group Antibiotic from *Nocardia asteroides*. *J. Antibiotics*. 55: 593-597.
- Odakura, Y., Kase, H., Itoh, S., Satoh, S., Takasawa, S., Takahashi, K., Shirahata, K., and Nakayama, K. 1984. Biosynthesis of astromicin and related antibiotics. *J. Antibiotics*. 37: 1670-1680.
- Odakura, Y., Kase, H., and Nakayama, K. 1983. Sagamicin and the related aminoglycosides: fermentation and biosynthesis. *J. Antibiotics*. 36: 125-130.
- Oki, T. 1994. S4-8 Recent Progress of Antibiotics Research *In Application Control of Microorganisms in Asia*. edited by. Komagata *et al.*, Japan : International Science and Technology Exchange Center., pp. 258-294.
- Otani, T., Sugimoto, Y., Aoyagi, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., Saito, N., Yamada, Y., Asao, T., and Oki, T. 2000. New Cdc25B Tyrosine Phosphatase Inhibitors, Nocardiones A and B, Produced by *Nocardia* sp. TP-A0248: Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structural Elucidation and Biological Properties. *J. Antibiotics*. 53: 337-344.
- Romero, F., Espliego, F., Baz, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F. C., and Puentes, J. L. F. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. *J. Antibiotics*. 50: 734-737.
- Saitoh, M. M., Morisaki, N., Tokiwa, Y., and Iwasaki, S. 1991. Dynemicins O, P, and Q: novel antibiotics related to dynemicin A isolation, characterization and biological activity. *J. Antibiotics*. 44: 1037-1044.

- Shanson, D.C. 1982. *Microbiology in Clinical Practice*. Wright PSG, London., p. 36.
- Shiring, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Skehan, P., Storeng, R., Scdiero, D., Mark, S.A., McMahan, S., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.
- Stefanska, A.L., Coates, N.J., Mensah, L.M., Pope, A.J., Ready, S.J. and Warr, S.R. 2000. SB-219383, a Novel Tyrosyl tRNA Synthetase Inhibitor from a *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics.* 53: 345-350.
- Sugawara, T., Tanaka, A., Imai, H., Nagai, K. and Suzuki, K. 1997. YM-47515, a Novel Isonitrile Antibiotic from *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*. *J. Antibiotics.* 50: 944-948.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd. pp. 463-470.
- Tani, M., Harimaya, K., Gyobu, Y., Sasaki, T., Takenouchi, O., Takashi, A., Kawamura, A., Kamimura, T., and Harada, T. 2004. SF2809 Compounds, Novel Chymase Inhibitors from *Dactylosporangium* sp. *J. Antibiotics.* 57: 89-96.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology, An Introduction*. 5th ed. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Umezawa, H. 1978. *Index of Actinomycetes Antibiotics*, USACO Corporation, Tokyo.
- Verlander, C.P. 1992. Detection of horseradish peroxidase by colorimetry, *In Nonisotopic DNA Probe Technique*, pp.185-201. Edited by L.J. Kricka. New York: Academic Press.
- Vertesy, L., Barbone, F. P., Cashmen, E., Decker, H., Ehrlich, K., Jordan, B., Knauf, M., Schummer, D., Segeth, M. P., Wink, J., and Seibert, G. 2001. Pluraflavins, Potent Antitumor Antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiotics.* 54: 718-729.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.

- Yang, S. W., Chan, T. M., Terracciano, J., Loebenberg, D., Chen, G., Patel, M., Gullo, V., Pramanik, B., and Chu, M. 2004. Structure Elucidation of a New Diketopiperazine Sch 725418 from *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 57: 345-347.
- Yasumuro, K., Shibasaki, M., Sasaki, I., Imai, H., Yamaguchi, H., Suzuki, K., and Morioka, M. 1994. 16-membered lactone compounds from izenamicins-producing *Micromonospora* sp. *J. Antibiotics*. 47: 250-252.
- Yeo, W.H., Lee, O.K., Yun, B.S., Woo, J.S., Kim, Y.K., Park, E.K., Kim, S.S., Kim, Y.H., Kim, S.K., Yoo, I.D., Whang, K.S. and Yu, S.H. 1998. 1-Hydroxycrisamicin A, a new Isochromanquinone antibacterial Antibiotic, Produced by *Micromonospora* sp. SA246. *J. Antibiotics*. 51: 82-84.
- Yeo, W. H., Yun, B. S., Kim, Y. H., Yu, S. H., Kim, H. M., Yoo, I. D., and Kim, Y. H. 2002. GTRI-BB, a New Cytotoxic Isochromanquinone Produced by *Micromonospora* sp. SA-246. *J. Antibiotics*. 55: 511-515.

ผลงานการตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

ได้ทำการตีพิมพ์ผลงานวิจัยเรื่อง *Actinaurispora siamensis*
gen. nov., sp. nov., a new member of the family
Micromonosporaceae ลงในวารสาร International Journal
of Systematic Evolutionary Microbiology มีค่า IMPACT
FACTOR = 2.3

Actinaurispora siamensis gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*

Chitti Thawai,^{1,2} Somboon Tanasupawat,³ Khanit Suwanborirux^{4,5} and Takuji Kudo⁶

Correspondence
Chitti Thawai
ktchitti@kmitl.ac.th

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Microbial Resource Management Unit, Scientific Instrument Center, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

³Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Bangkok 10330, Thailand

⁵Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁶Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Two actinomycete strains, CM2-8^T and CM2-12, were isolated from temperate peat swamp forest soil in Chiang Mai Province, Thailand. Their taxonomic positions were determined using a polyphasic approach. Chemotaxonomic characteristics of these strains coincided with those of the family *Micromonosporaceae*, i.e. cell wall chemotype II, *N*-glycolyl type of muramic acid, and type II phospholipids. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence data also indicated that these strains fell within the family *Micromonosporaceae* and formed a distinct taxon in the *Micromonosporaceae* phylogenetic tree. On the basis of phylogenetic analysis, characteristic patterns of 16S rRNA gene signature nucleotides and chemotaxonomic data, it is proposed that the novel isolates belong to a new genus, *Actinaurispora* gen. nov. The type species of the genus is proposed as *Actinaurispora siamensis* sp. nov., with strain CM2-8^T (=JCM 15677^T=BCC 34762^T) as the type strain.

The family *Micromonosporaceae* was first described by Krasil'nikov (1938), and amended by Koch *et al.* (1996), Stackebrandt *et al.* (1997) and Zhi *et al.* (2009), who classified 17 genera [*Actinocatenispora* (Thawai *et al.*, 2006), *Actinoplanes* (Couch, 1950), *Asanoa* (Lee & Hah, 2002), *Catellatospora* (Asano & Kawamoto, 1986), *Catenuloplanes* (Yokota *et al.*, 1993), *Couchioplanes* (Tamura *et al.*, 1994), *Dactylosporangium* (Thiemann *et al.*, 1967), *Longispora* (Matsumoto *et al.*, 2003), *Micromonospora* (Ørskov, 1923),

Pilimelia (Kane, 1966), *Polymorphospora* (Tamura *et al.*, 2006), *Planosporangium* (Wiese *et al.*, 2008), *Pseudosporangium* (Ara *et al.*, 2008a), *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005), *Spirilliplanes* (Tamura *et al.*, 1997), *Verrucosispora* (Rheims *et al.*, 1998) and *Virgisporangium* (Tamura *et al.*, 2001)] within this family on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. Two actinomycete genera, *Luedemannella* (Ara & Kudo, 2007a) and *Krasilnikovia* (Ara & Kudo, 2007b), have since been described as additional members of the family. Recently, *Catellatospora koreensis* and *Catellatospora tsunoense* were transferred to the genera *Catelliglobospora* (as *Catelliglobospora koreensis*) and *Hamadaea* (as *Hamadaea tsunoensis*), respectively, based on 16S rRNA gene sequence analysis and chemotaxonomic data (Ara *et al.*, 2008b).

During an investigation of the actinomycete diversity of soils in northern Thailand, two strains, CM2-8^T and CM2-12, which showed chemotaxonomic characteristics that were typical of members of the family *Micromonosporaceae*

Abbreviation: DAP, diaminopimelic acid.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of strains CM2-8^T and CM2-12 are AB454379 and AB465341, respectively.

Phylogenetic trees based on almost complete 16S rRNA gene sequences constructed using the neighbour-joining, maximum-parsimony and minimum-evolution methods and tables giving the fatty acid composition and 16S rRNA gene signature nucleotide positions of strains CM2-8^T and CM2-12 and related strains/species are available with the online version of this paper.

but which represented a novel phylogenetic lineage, were isolated. In this report, these strains were characterized using a polyphasic approach and it is proposed that they be classified as representatives of a novel species in a new genus.

Strains CM2-8^T and CM2-12 were isolated from temperate peat swamp forest soil in Chiang Mai Province, Thailand. Samples were taken from the soil surface and kept at 4 °C. The sampling and isolation methods have been described by Thawai *et al.* (2004) and pure cultures were kept at 4–10 °C on yeast extract-malt extract agar (ISP 2 medium) slants.

Strains CM2-8^T and CM2-12 were grown for 14 days at 30 °C on humic acid-vitamin agar and observed by light and scanning electron microscopy (model JSM-5410 LV; JEOL). Samples for scanning electron microscopy were prepared as described previously (Itoh *et al.*, 1989).

Cultural, physiological and biochemical characteristics were examined by using several standard methods; cultural characteristics were tested using 21 day cultures grown at 30 °C on various media. The Jacal Colour Card L2200 (Japan Colour Research Institute) was used for determining colour designations and names. Decomposition of various compounds was examined using the basal medium recommended by Gordon *et al.* (1974). Temperature, NaCl and pH tolerance were determined on ISP 2 medium. Carbon source utilization was tested using ISP 9 medium (Shirling & Gottlieb, 1966) supplemented with a final concentration of 1% of the tested carbon sources and 0.05% Casamino acids. Gelatin liquefaction, peptonization of milk, nitrate reduction and starch hydrolysis were determined by cultivation on various media as described by Arai (1975) and Williams & Cross (1971). Melanin and hydrogen sulphide production were examined on tyrosine agar and peptone iron agar slants supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract.

Freeze-dried cells used for chemotaxonomic analyses were obtained from cultures grown in yeast extract-malt extract broth (ISP 2 broth) on a rotary shaker at 30 °C for 5 days. Cell wall peptidoglycan was prepared and hydrolysed according to Kawamoto *et al.* (1981) and the amino acid composition was analysed with an automatic amino acid analyser. The cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers were determined by the method of Stanek & Roberts (1974). The acyl group of the muramic acid in the peptidoglycan was determined by the method of Uchida & Aida (1984). Reducing sugars from whole-cell hydrolysates were analysed by the HPLC method of Mikami & Ishida (1983). Cell phospholipids were extracted and analysed by the method of Minnikin *et al.* (1984). Fatty acid methyl ester analysis was performed by GLC according to the instructions of the Microbial Identification System (MIDI) (Sasser, 1990; Kämpfer & Kroppenstedt, 1996). The presence of mycolic acids was investigated by using the method of Minnikin *et al.* (1975). Isoprenoid quinones were extracted by the method of Collins *et al.*

(1977) and analysed by HPLC equipped with a Cosmosil 5C₁₈ column (4.6 × 150 mm; Nacalai Tesque). The elution solvent was a mixture of methanol and 2-propanol (2:1, v/v).

Chromosomal DNA was isolated from cells grown in ISP 2 broth according to the method of Tamaoka (1994). The DNA G+C content was determined using the HPLC method of Tamaoka & Komagata (1984). An equimolar mixture of nucleotides for analysis of DNA base composition (Yamasa Shoyu) was digested by bacterial alkaline phosphatase into nucleosides and used as the quantitative standard. DNA–DNA hybridization was conducted in microdilution plates, as reported by Ezaki *et al.* (1989). Hybridization was carried out at 55 °C for 2 h. DNA–DNA relatedness (%) was determined by using the colorimetric method (Verlander, 1992).

Genomic DNA extraction, PCR-mediated amplification of the 16S rRNA gene and sequencing of PCR products were carried out as described by Nakajima *et al.* (1999). The 16S rRNA gene sequence was multiply aligned with selected sequences obtained from the GenBank/EMBL/DDBJ databases using CLUSTAL W version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). Alignment was verified manually and adjusted prior to the construction of a phylogenetic tree. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), maximum-parsimony (Kluge & Farris, 1969) and minimum-evolution (Felsenstein, 1997) methods in the MEGA program version 2.1. Confidence values of branches of the phylogenetic tree were determined using bootstrap analyses (Felsenstein, 1985) based on 1000 resamplings. Sequence similarity values between closely related strains were determined using the EzTAXON server (Chun *et al.*, 2007).

Strains CM2-8^T and CM2-12 produced well-developed and branched substrate hyphae on ISP 2 agar, but no aerial hyphae. Spores were borne singly on the substrate hyphae and were 0.4–0.6 mm in diameter (Fig. 1). Spores had a rough surface and were non-motile. Colonies of strains CM2-8^T and CM2-12 were strong reddish orange in colour and did not darken after sporulation; soluble pigments were not produced on most of the media tested, with the exception of a pale-yellow pigment on ISP 2 agar. Physiological and biochemical characteristics of the strains are presented in the species description.

Cell-wall hydrolysates of the two novel isolates contained glutamic acid, glycine, alanine and *meso*-DAP, indicating that these strains have wall chemotype II (described by Lechevalier & Lechevalier, 1970); the peptidoglycan was of type A1 γ (described by Schleifer & Kandler, 1972). The acyl moiety of murein contained glycolyl residues. The isolates contained glucose, galactose, xylose and mannose as whole-cell sugars, but not arabinose or ribose. The characteristic phospholipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides and phosphatidylethanolamine; phosphatidylcholine was not present.

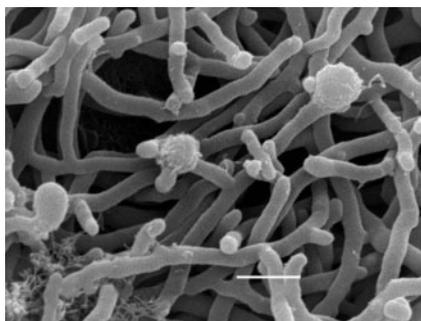


Fig. 1. Scanning electron micrograph of strain CM2-8^T. Bar, 1 μ m.

This pattern corresponds to phospholipid type II of Lechevalier *et al.* (1977). The cellular fatty acid compositions are shown in Supplementary Table S1, available in IJSEM Online. The major fatty acids of CM2-8^T and CM2-12 were iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{17:0}, anteiso-C_{15:0} and iso-C_{17:0}; 10-methyl-C_{17:0} was also found. This pattern corresponds to fatty acid type 3b described by Kroppenstedt (1985). Mycolic acids were not detected. The predominant menaquinones found in the isolates were MK-9(H₆) (41.7%), MK-10(H₆) (15.9%), MK-9(H₈) (9.4%) and MK-10(H₈) (5.4%); small amounts of MK-9(H₄) (1.3%), MK-10(H₄) (0.7%) and MK-9(H₂) (0.5%) were also present. The DNA G+C contents for strains CM2-8^T and CM2-12 were 72.6 and 72.2 mol%, respectively.

These chemotaxonomic characteristics, in particular the cell-wall type (type II), the muramic acid acyl type (*N*-glycolyl), the absence of mycolic acids and the phospholipid type (type II), suggest that strains CM2-8^T and CM2-12 are members of the family *Micromonosporaceae*.

Almost complete 16S rRNA gene sequences of isolates CM2-8^T (1446 nt) and CM2-12 (1450 nt) were compared against 16S rRNA gene sequences of all members of the genus *Micromonospora* and all members of the family *Micromonosporaceae*. Phylogenetic analysis based on this large dataset revealed that the novel isolates belonged to a cluster of the family *Micromonosporaceae* (see Supplementary Figs S1, S2 and S3, available in IJSEM Online). When the sequences of CM2-8^T and CM2-12 were compared with selected 16S rRNA gene sequences of all genera in the family *Micromonosporaceae* and the 16S rRNA gene sequence of *Streptomyces ambofaciens* (used as an outgroup), it was observed that they represented a new phyletic line that was different from all described genera in this family (Fig. 2). The highest levels of similarity were with *Micromonospora eburnea* JCM 12345^T (97.9%), *Micromonospora auratinigra* JCM 12357^T (97.5%), *Salinispora arenicola* CNH-643^T (97.4%), *Micromonospora nigra* DSM 43818^T (97.3%) and *Salinispora tropica* CNB-440^T (97.3%). Although the two novel isolates showed highest levels of 16S rRNA gene sequence similarity to members of the genus

Micromonospora, phylogenetic analysis indicated that the isolates did not cluster within the genus *Micromonospora* but were related to members of the genus *Salinispora*. Signature nucleotides of the 16S rRNA gene sequence of the isolates were shared in all but one position (840:846 according to the *Escherichia coli* numbering scheme) with genera of the family *Micromonosporaceae* (Zhi *et al.*, 2009). However, signature nucleotides of the novel isolates differed from those of their closest neighbours, members of the genera *Micromonospora* and *Salinispora*, in several positions (Supplementary Table S2, available in IJSEM Online) and clearly differentiate the novel strains from both of these genera. The gene sequence similarity between isolates CM2-8^T and CM2-12 was 100%. The DNA–DNA relatedness value between the two novel isolates was 88.9 \pm 0.8%.

Members of the two genera *Micromonospora* and *Salinispora* seem to be most closely related to isolates CM2-8^T and CM2-12. Members of the genus *Salinispora* require seawater for growth. The initial colour of colonies is orange to deep orange and can become darkened after sporulation. They have arabinose, galactose and xylose as diagnostic sugars in whole-cell hydrolysates, MK-9(H₄) as the major menaquinone component and fatty acid type 3a. Members of the genus *Micromonospora* have arabinose and xylose as the major sugars, and MK-10(H_{4,6}) and MK-9(H_{4,6}) as the predominant menaquinone components. All members of this genus exhibit yellowish white to orange brown substrate mycelia and turn greyish black to black after sporulation. Isolates CM2-8^T and CM2-12 can be clearly distinguished from members of these two genera in terms of colony colour, physiological characteristics (i.e. the requirement of seawater for growth), characteristic whole-cell sugars, predominant menaquinones and fatty acid composition.

These data suggest that the novel isolates do not belong to any known genera of the family *Micromonosporaceae*. Differential characteristics for the isolates and members of related genera in the family *Micromonosporaceae* are shown in Table 1.

On the basis of phenotypic, chemotaxonomic and genotypic data, isolates CM2-8^T and CM2-12 are readily distinguishable from the members of all established genera in the family *Micromonosporaceae*. Therefore, it is proposed that isolates CM2-8^T and CM2-12 should be classified as representatives of a novel species in a new genus, for which the name *Actinaurispora siamensis* gen. nov., sp. nov. is proposed.

Description of *Actinaurispora* gen. nov.

Actinaurispora [Ac.tin.au.ri.spo'ra. Gr. n. *actis* -inos ray; L. n. *aurum* gold, the colour of gold; N.L. fem. n. *spora* (from Gr. n. *spora* seed) a spore; N.L. fem. n. *Actinaurispora* ray (fungus) producing orange spores].

Gram-positive, non-acid-fast and aerobic. Form extensively branched substrate hyphae. Colonies are strong

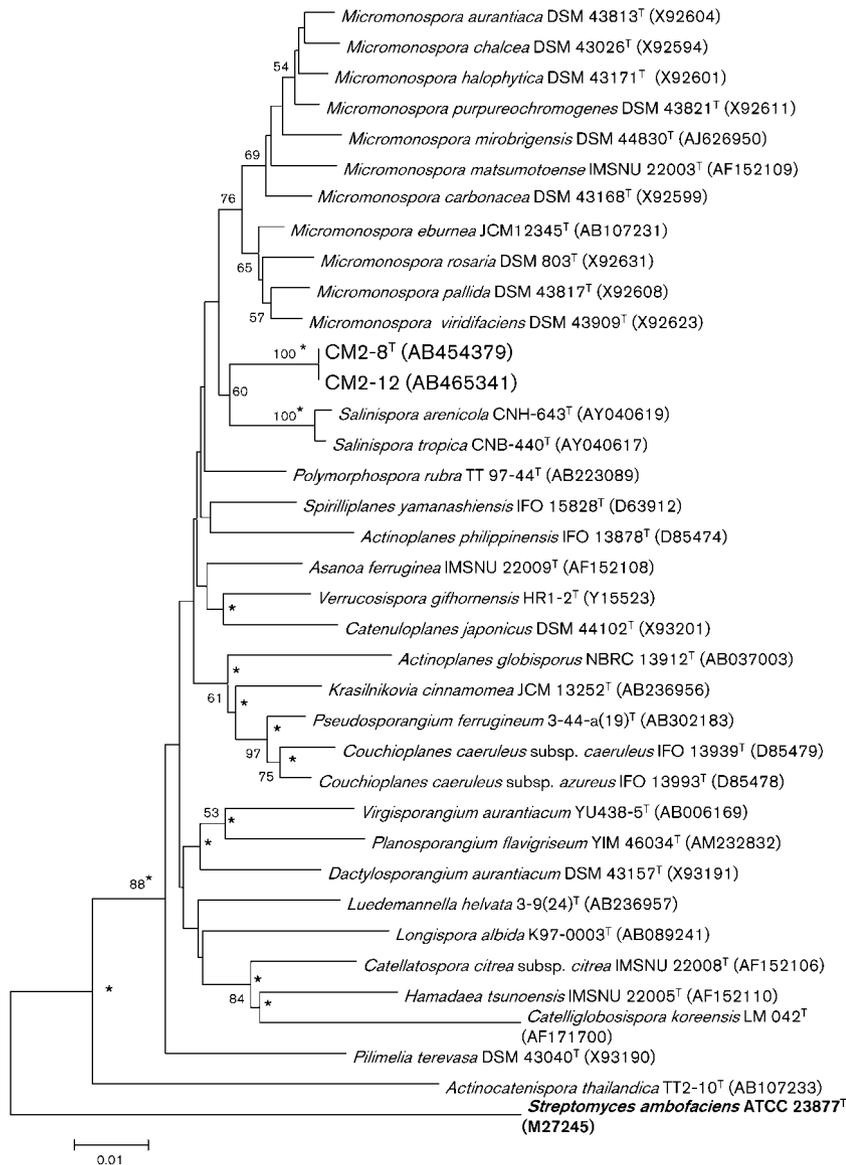


Fig. 2. Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) based on almost complete 16S rRNA gene sequences showing the relationships between CM2-8^T, CM2-12, and strains of all type species of recognized representative members of the family *Micromonosporaceae*. The 16S rRNA gene sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877^T was used as an outgroup. Asterisks indicate branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony (Kluge & Farris, 1969) and minimum-evolution (Felsenstein, 1997) methods. Bootstrap values (%) of 1000 replicates are indicated at branch-points; only values >50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

reddish orange in ISP 2 medium and do not darken after sporulation. Single spores with rough-surfaced spores (0.4–0.6 µm in diameter) are formed on substrate hyphae. Aerial mycelium is absent. Spores are non-motile. A pale-yellow pigment is produced in ISP 2. Cell wall contains glutamic acid, glycine, alanine and *meso*-DAP. The *N*-acyl group of the cell wall muramic acid is glycolyl. Glucose, xylose, mannose and galactose are detected as whole-cell sugars. Contains phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol mannosides as cellular phospholipids (phospholipid pattern type II). Predominant menaquinones are MK-9(H₆), MK-10(H₆), MK-9(H₈) and MK-10(H₈); minor components are MK-9(H₄), MK-10(H₄) and MK-9(H₂). The major fatty acids are iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{17:0}, anteiso-C_{15:0} and iso-C_{17:0}; 10-methyl-C_{17:0} is also found. Mycolic acids are not detected. Isolated from soil. The type species is *Actinaurispora siamensis*.

Description of *Actinaurispora siamensis* sp. nov.

Actinaurispora siamensis (si.am.en'sis. N.L. fem. adj. *siamensis* pertaining to Siam, the old name for Thailand, the country of origin of the soil from which the type strain was isolated).

Morphological, chemotaxonomic and general characteristics are as described for the genus. Utilizes D-glucose, L-rhamnose, melibiose, lactose, D-galactose, cellobiose, D-fructose and D-xylose, but not D-mannitol, D-ribose, raffinose, glycerol, salicin or L-arabinose. Weakly positive for peptonization of milk and gelatin liquefaction. Negative for hydrolysis of starch, formation of melanin, H₂S production and reduction of nitrate. The optimal temperature for growth is 25–30 °C. No growth occurs above 40 °C. Minimum pH tolerated is 5. Maximum NaCl concentration for growth is 1.5%. Does not require seawater for growth.

Table 1. Differential characteristics of the genus *Actinaurispora* and related genera

Taxa: 1, *Actinaurispora* gen. nov.; 2, *Actinocatenispora*; 3, *Actinoplanes*; 4, *Asanoa*; 5, *Catellatospora*; 6, *Catenuloplanes*; 7, *Couchioplanes*; 8, *Dactylosporangium*; 9, *Longispora*; 10, *Luedemannella*; 11, *Micromonospora*; 12, *Pilimelia*; 13, *Polymorphospora*; 14, *Salinispora*; 15, *Spirilliplanes*; 16, *Verrucosisporea*; 17, *Virgisporangium*; 18, *Planosporangium*; 19, *Pseudosporangium*; 20, *Krasilnikovia*; 21, *Hamadaea*; 22, *Catelliglobospora*. Data are from Thawai *et al.* (2006), Couch (1950), Goodfellow *et al.* (1990), Lee *et al.* (2000), Lee & Hah (2002), Asano & Kawamoto (1986), Ara & Kudo (2006, 2007a, b), Yokota *et al.* (1993), Kudo *et al.* (1999), Tamura *et al.* (1994, 1997, 2001, 2006), Thiemann *et al.* (1967), Matsumoto *et al.* (2003), Ørskov (1923), Kane (1966), Maldonado *et al.* (2005), Rheims *et al.* (1998), Stackebrandt & Kroppenstedt (1987), Vobis (1989), Wiese *et al.* (2008) and Ara *et al.* (2008a, b). +, Present; -, absent; ND, not determined. Ara, Arabinose; Gal, galactose; Rham, rhamnose; Rib, ribose; Man, mannose; Xyl, xylose.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Spore chains	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	ND	+	+
Spore motility	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+/-	-	-	-	-
Seawater requirement for growth*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
Diamino acid	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	L-Lys	L-Lys	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP, 3-OH-DAP	<i>m</i> -DAP	<i>m</i> -DAP, 3-OH-DAP	<i>m</i> -DAP
Major menaquinone(s) (MK-)	9(H ₆), 10(H ₆)	9(H _{4,6})	9(H ₄), 10(H ₄)	10(H _{6,8}), 9(H _{4,6})	10(H _{8,6}), 9(H _{4,6})	9(H ₈), 10(H ₈)	9(H ₄)	9(H _{4,6,8})	10(H _{4,6})	9(H _{4,6})	10(H _{4,6}), 9(H _{2,4})	10(H _{4,6}), 9(H _{6,4})	9(H ₄)	10(H ₄)	9(H ₄)	10(H _{4,6})	9(H ₄), 10(H ₄)	9(H ₆)	9(H _{6,4,8})	9(H ₆)	10(H ₄)	
Phospholipid type†	PII	PII	PII	PII	PII	PIII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII	PII
Fatty acid type‡	3b	3b	2d	2d	3b	2c	2c	3b	2d	2d	3b	2d	2a	3a	2d	2b	2d	3b	2d	2d	3b	3b
Characteristic whole-cell sugars	Xyl, Man, Gal	Ara, Gal, Xyl	Ara, Xyl	Ara, Gal, Xyl	Ara, Gal, Xyl/Xyl only	Xyl	Ara, Xyl, Gal	Ara, Xyl	Ara, Gal, Xyl	Ara, Gal, Xyl	Ara, Xyl	Ara, Xyl	Xyl	Ara, Gal, Xyl	Gal, Xyl	Man, Xyl	Ara, Gal, Xyl	Ara, Xyl	Gal, Rib, Man, Xyl, Ara	Gal, Man, Xyl, Ara, Rib	Xyl, Gal, Man, Rib, Ara	Rham, Man, Xyl, Gal
DNA G+C content (mol%)	72	72	72-73	71-72	71-72	71-73	70-72	72-73	70	71	71-73	ND	71	70-73	69	70	71	71.4	73	71	70	70

*Data from Maldonado *et al.* (2005).

†According to the classification of Lechevalier *et al.* (1977).

‡According to the classification of Kroppenstedt (1985).

The type strain is CM2-8^T (=JCM 15677^T=BCC 34762^T), isolated from temperate peat swamp forest soil in Chiang Mai Province, Thailand. The DNA G+C content of the type strain is 72.6 mol%.

Acknowledgements

The research grant from the office of the National Research Council of Thailand (NRCT) to C.T. is gratefully acknowledged. We are grateful to the Center of Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and the Microbial Resource Management Unit, Scientific Instrument Center, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for supporting this project.

References

- Ara, I. & Kudo, T. (2006).** Three novel species of the genus *Catellatospora*, *Catellatospora chokoriensis* sp. nov., *Catellatospora coxensis* sp. nov. and *Catellatospora bangladeshensis* sp. nov., and transfer of *Catellatospora citrea* subsp. *methionotrophica* Asano and Kawamoto 1988 to *Catellatospora methionotrophica* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 393–400.
- Ara, I. & Kudo, T. (2007a).** *Luedemannella* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae* and description of *Luedemannella helvata* sp. nov. and *Luedemannella flava* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* **53**, 39–51.
- Ara, I. & Kudo, T. (2007b).** *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae* and description of *Krasilnikovia cinnamomea* sp. nov. *Actinomycetologica* **21**, 1–10.
- Ara, I., Matsumoto, A., Bakir, M. A., Kudo, T., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008a).** *Pseudosporangium ferrugineum* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1644–1652.
- Ara, I., Bakir, M. A. & Kudo, T. (2008b).** Transfer of *Catellatospora koreensis* Lee *et al.* 2000 as *Catelliglobospora koreensis* gen. nov., comb. nov. and *Catellatospora tsunoense* Asano *et al.* 1989 as *Hamadaea tsunoensis* gen. nov., comb. nov., and emended description of the genus *Catellatospora* Asano and Kawamoto 1986 emend. Lee and Hah 2002. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1950–1960.
- Arai, T. (1975).** *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for Actinomycetes Japan.
- Asano, K. & Kawamoto, I. (1986).** *Catellatospora*, a new genus of the *Actinomycetales*. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 512–517.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007).** EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259–2261.
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* **100**, 221–230.
- Couch, J. N. (1950).** *Actinoplanes*. A new genus of the *Actinomycetales*. *J Elisha Mitchell Sci Soc* **66**, 87–92.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224–229.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Felsenstein, J. (1997).** An alternating least-squares approach to inferring phylogenies from pairwise distances. *Syst Biol* **46**, 101–111.
- Goodfellow, M., Stanton, L. J., Simpson, K. E. & Minnikin, D. E. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J Gen Microbiol* **136**, 19–36.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. & Pang, C. H.-N. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* **24**, 54–63.
- Itoh, T., Kudo, T., Parenti, F. & Seino, A. (1989).** Amended description of the genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 168–173.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989–1005.
- Kane, W. D. (1966).** A new genus of the *Actinoplanaceae*, *Pilimelia*, with a description of two species, *Pilimelia terevasa* and *Pilimelia anulata*. *J Elisha Mitchell Sci Soc* **82**, 220–230.
- Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1981).** Cell wall composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *J Bacteriol* **146**, 527–534.
- Kluge, A. G. & Farris, J. S. (1969).** Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* **18**, 1–32.
- Koch, C., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A. & Stackebrandt, E. (1996).** 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 765–768.
- Krasil'nikov, N. A. (1938).** *Ray Fungi and Related Organisms – Actinomycetales*. Moscow: Akademii Nauk SSSR.
- Kroppenstedt, R. M. (1985).** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (Society for Applied Bacteriology Technical Series vol. 20), pp. 173–199. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. New York: Academic Press.
- Kudo, T., Nakajima, Y. & Suzuki, K. (1999).** *Catenuloplanes crispus* (Petroli *et al.* 1993) comb. nov.: incorporation of the genus *Planopolyspora* Petroli 1993 into the genus *Catenuloplanes* Yokota *et al.* 1993 with an amended description of the genus *Catenuloplanes*. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1853–1860.
- Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* **20**, 435–443.
- Lechevalier, M. P., De Bièvre, C. & Lechevalier, H. A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* **5**, 249–260.
- Lee, S. D. & Hah, Y. C. (2002).** Proposal to transfer *Catellatospora ferruginea* and '*Catellatospora ishikariense*' to *Asanoa* gen. nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov. and *Asanoa ishikariensis* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 967–972.
- Lee, S. D., Kang, S. O. & Hah, Y. C. (2000).** *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1103–1111.
- Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T. & Goodfellow, M. (2005).** *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1759–1766.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shinose, M., Seino, A., Iwai, Y. & Omura, S. (2003).** *Longispora albida* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1553–1559.

- Mikami, H. & Ishida, Y. (1983). Post-column fluorometric detection of reducing sugars in high-performance liquid chromatography using arginine. *Bunseki Kagaku* **32**, E207–E210.
- Minnikin, D. E., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1975). Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* **88**, 200–204.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233–241.
- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K. & Kudo, T. (1999). *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1761–1767.
- Ørskov, J. (1923). *Investigations into the Morphology of the Ray Fungi*. Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Rheims, H., Schumann, P., Rohde, M. & Stackebrandt, E. (1998). *Verrucosipora giffhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1119–1127.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sasser, M. (1990). *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids*, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407–477.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313–340.
- Stackebrandt, E. & Kroppenstedt, R. M. (1987). Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch, and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst Appl Microbiol* **9**, 110–114.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479–491.
- Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* **28**, 226–231.
- Tamaoka, J. (1994). Determination of DNA base composition. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 463–470. Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. Chichester: Wiley.
- Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**, 125–128.
- Tamura, T., Nakagaito, Y., Nishii, T., Hasegawa, T., Stackebrandt, E. & Yokota, A. (1994). A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 193–203.
- Tamura, T., Hayakawa, M. & Hatano, K. (1997). A new genus of the order *Actinomycetales*, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 97–102.
- Tamura, T., Hayakawa, M. & Hatano, K. (2001). A new genus of the order *Actinomycetales*, *Virgosporangium* gen. nov., with descriptions of *Virgosporangium ochraceum* sp. nov. and *Virgosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1809–1816.
- Tamura, T., Hatano, K. & Suzuki, K. (2006). A new genus of the order *Actinomycetales*, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1959–1964.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T. (2004). *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica* **18**, 8–14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. & Kudo, T. (2006). *Actinocatenispora thailandica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1789–1794.
- Thiemann, J. E., Pagani, H. & Beretta, G. (1967). A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Dactylosporangium*, gen. nov. *Arch Mikrobiol* **58**, 42–52.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Uchida, K. & Aida, K. (1984). An improved method for the glycolate test for simple identification of acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* **30**, 131–134.
- Verlander, C. P. (1992). Detection of horseradish peroxidase by colorimetry. In *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 185–201. Edited by L. J. Kricka. New York: Academic Press.
- Vobis, G. (1989). Actinoplanetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2418–2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Wiese, J., Jiang, Y., Tang, S.-K., Thiel, V., Schmaljohann, R., Xu, L.-H., Jiang, C.-L. & Imhoff, J. F. (2008). A new member of the family *Micromonosporaceae*, *Planosporangium flavigriseum* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1324–1331.
- Williams, S. T. & Cross, T. (1971). Actinomycetes. In *Methods in Microbiology*, vol. 4, pp. 295–334. Edited by C. Booth. London: Academic Press.
- Yokota, A., Tamura, T., Hasegawa, T. & Huang, L. H. (1993). *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 805–812.
- Zhi, X. Y., Li, W. J. & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 589–608.