รายงานผลการดำเนินงานโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

โครงการ การตรวจวินิจฉัยและเก็บรวบรวมแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดิน ในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

หัวหน้าโครงการ
ผศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้ร่วมโครงการ
อาจารย์รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ได้รับจัดสรรงบประมาณดำเนินโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรมจาก
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพ.ศ. 2548 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ. ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ขอขอบคุณ นายอิสสระ นูรักษา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล และขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัย

เลขหมู่ทาง วร GR62.P35 T45
เลขทะเบียน ขท. 66797
วันเดือนปี 14 มิ.ย. 2549

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
หลักการและเหตุผล	1
วัตถุประสงค์	4
กลุ่มเป้าหมาย	5
แผนการปฏิบัติงาน	5
ผลการดำเนินโครงการ	7
สรุปผลการดำเนินโครงการฯ และข้อเสนอแนะ	19
ปัญหาและอุปสรรค	20
บรรณานุกรม	20

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แหล่งตัวอย่างดิน และจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้	8
ตารางที่ 2	ลักษณะสีของโคโลนีและการสร้างสารสีของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 เป็นเวลา 10-20 วัน	10
ตารางที่ 3	ชนิดของเส้นใยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้	13
ตารางที่ 4	ชนิดของ DAP น้ำตาลและลักษณะของเส้นใยของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้	17
ตารางที่ 5	ชนิดของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีในการจัดจำแนก	18

หลักการและเหตุผล

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี มีพื้นที่ประมาณ 5,700 ตารางกิโลเมตร เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่พบทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ ซากพืชซากสัตว์ เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคติโนมัยสีท โดยเฉพาะแอคติโนมัยสีท เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา เจริญช้ากว่าเชื้อราและแบคทีเรียกลุ่มอื่น แอคติโนมัยสีทสามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ นอกจากนี้แอคติโนมัยสีท ยังสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ดินที่มีสภาพเป็นกรด ดินที่มีสภาพเป็นด่าง ดินเค็ม ดินตามป่าและดินในเขตอุตสาหกรรม ทำให้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มีความแตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ การที่จะซื้อหรือนำเข้าเชื้อจากแหล่งอื่นเข้ามาใช้ในอุตสาหกรรมของประเทศไทย นอกจากจะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงแล้ว ยังอาจใช้ไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากแหล่งตัวอย่างในประเทศไทยและเก็บรักษาไว้ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ จึงมีความสำคัญเพราะจะเป็นการรวบรวมฐานข้อมูลที่มีประโยชน์ของชุมชนท้องถิ่น และจะเป็นทาง เลือกหนึ่งที่จะนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ค้นพบเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มีความสำคัญเชิงการแพทย์และอุตสาหกรรมได้ตรงเป้าหมายยิ่งขึ้น

แอคติโนมัยสีท เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) มีปริมาณ GC content มากกว่า 55 % GC แอคติโนมัยสีทมีถิ่นอาศัยโดยทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำ โคลนตม และบริเวณรากพืช เป็นต้น มีการดำรงชีวิตแบบอิสระ (free living) และแบบ saprotrophic บางชนิดดำรงชีวิตแบบ symbiotic บางชนิดทำให้เกิดโรคในคน สัตว์และพืช แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียประเภทchemoorgano trophs จึงสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นได้หลายชนิด รวมทั้ง cellulose, chitin, keratin, parafins and rubber แอคติโนมัยสีทบางชนิดสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะที่สำคัญหลายชนิดเช่น *Streptomyces* ผลิต streptomycin และ actinomycin (Singleton and Sainsbury, 1997)

การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินมักจะพบเชื้อ *Streptomyces* spp. อยู่เสมอ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดอื่นเจริญได้ช้าและมีปริมาณน้อยกว่า แอคติโนมัยสีทชนิดอื่นนอกเหนือจากจีนัส *Streptomyces* จัดว่าเป็นแอคตโนมัยสีทที่หายาก ซึ่งได้แก่จีนัส *Micromonospora, Microtetraspora, Microbiospora Streptosporangium, Actinomadura, Microbiospora, Nocardia, Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น (Hayakawa, และคณะ,1988) ดังนั้นเพื่อให้สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายาก จึงมีการพัฒนาวิธีที่เฉพาะในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยใช้วิธีเฉพาะในการเตรียมตัวอย่าง เช่น การใช้ความร้อนแห้ง อบตัวอย่างที่อุณหภูมิระดับต่างๆ หรือการใช้สารละลายด่างหรือสารละลายฟีนอลแช่ตัวอย่างดิน เป็นต้น รวมทั้งการแยกเชื้อแอคติโนมัย สีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective media ที่เติมสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น cycloheximide rifamycin nystatin nalidixic acid หรือ tunicamycin เป็นต้น และบ่มเป็นระยะเวลา

นานขึ้น (Athalye และคณะ, 1981; Williams and Vickers, 1988; Nonomura and Hayakawa, 1988: Hayakawa และคณะ, 1991(a, b); Iwai and Takahashi, 1992; Hayakawa และคณะ, 1996) การเลือกโคโลนีลักษณะต่าง ๆ ที่ไม่ค่อยพบหรือที่มีขนาดเล็กซึ่งอาจเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญในการสังเกต

ปริมาณแอคติโนมัยสีทในดินขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพและพีเอช (pH) ของดินและปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน โดยทั่วไปในดินมีเชื้อแอคติโนมัยสีทอยู่ในช่วง 10^5-10^8 เซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม ในดินที่มีสภาพเป็นด่างและแห้ง จะพบแอคติโนมัยสีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแอคติโนมัยสีทจะลดลงในดินที่สภาพเป็นกรดและดินที่เปียกชื้น (Alexander, 1961) ประมาณ 80% ของปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทจะพบในชั้นดินอยู่ส่วนที่ลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร และจะพบในส่วนของดินที่ลึกไม่เกิน 1 เมตร เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ชอบกรด (acidiophile) พบกระจายทั่วไปในดินที่เป็นกรดเช่นเดียวกับดินที่เป็นกลางโดยมีประมาณ 10^3-10^5 เซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม

Khan และ Williams (1975) สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ชนิดที่ชอบความเป็นกรดได้ 174 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันตามลักษณะและสีของโคโลนี นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าดินในเขตที่ภูมิอากาศร้อน มีจำนวนแอคติโนมัยสีทมากกว่าดินในเขตอบอุ่น (Alexander, 1961) แม้เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 25-30°ซ อย่างไรก็ตามเชื้อแอคติโนมัยสีทพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-65°ซ ก็สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ปุ๋ยคอกและกองปุ๋ยหมัก (Cross, 1968)

Hayakawa และคณะ (1988) พบว่าการกระจายตัวของแอคติโนมัยสีทชนิดที่หายากขึ้นอยู่กับชนิดของดิน ปริมาณฮิวมัส พีเอช และลักษณะของกรดฮิวมิก ดินที่มีการเพาะปลูกซึ่งมีปริมาณฮิวมัสสูงและพีเอชประมาณ 6.5.-7.0 มีปริมาณแอคติโนมัยสีทสูงสุด ส่วนในดินที่เป็นกรด (pH 5.0-6.5) และมีปริมาณฮิวมัสสูงจะพบยีนัส *Microbiospora* และ *Streptosporangium* มากที่สุด ส่วน *Saccharomonospora* พบมากในดินที่เป็นด่าง (pH 7.0-7.5) และปริมาณฮิวมัสต่ำ

Hatano (1997) พบว่าปริมาณแอคติโนมัยสีทในดินป่าชายเลนอยู่ระหว่าง 10^3-10^4 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม โดยพบจีนัส *Micromonospora* สูงสุดประมาณ 55% และรองมาเป็น *Streptomyces* ประมาณ 33% นอกจากนั้นยังมีแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น เช่น *Actinomadura, Microtetraspora, Microbiospora, Streptosporangiumc* และ *Actinoplanes* เป็นต้น

Srivibool (1997) ได้แยกและจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าชายเลนในเขตชายฝั่งตะวันออก พบว่าเชื้อ *Actinomadura* เป็นแอคติโนมัยสีทที่พบมากที่สุด และรองมา *Streptomyces* นอกจากนี้ยังพบแอคติโนมัยสีทที่หายากชนิดอื่นอีกหลายชนิด

Kitpreechavanich และคณะ (1997)ได้แยกแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าห้วยขาแข้ง พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Streptomyces* และยังพบชนิดอื่นที่หายากได้แก่ *Microbispora, Streptosporangium, Micromonospora, Nocardia, Amycolaptosis, Actinomadura/Thermomonospora sensu stricto* และ *Saccharomonospora* ด้วย

Nakajima และคณะ (1999) แยกได้ *Microbispora corallina sp. nov* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากดินในป่าเต็งรังในประเทศไทย Wang และคณะ (1999) แยกแอคติโนมัยสีทจากดินในประเทศสิงคโปร์ พบว่ามี *Streptomyces, Micromonospora, Actinoplanes, Actinomadura, Nocardia, Nonomuria* และ *Streptosporangium* มาก ซึ่งนับว่ามีความหลากหลายสูง

Xu and Jiang (1996) แยกแอคติโนมัยสีทจากดินของมณฑลยูนนาน ประเทศจีน พบว่าในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้นมีความหลากหลายมากกว่าเขตอบอุ่นที่เป็นบนภูเขาและบริเวณที่มีหิมะปกคลุม และดินในป่าจะมีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทมากกว่าเขตที่ทำการเกษตร ส่วนบริเวณที่แห้งแล้งจำนวนแอคติโนมัยสีทจะลดลงเมื่อความอุดมสมบูรณ์ลดลง

Kitpreechavanich และคณะ(1997) ได้แยกแอคติโนมัยสีทจากดินในป่าห้วยขาแข้ง พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* และยังพบชนิดอื่นที่หายาก ได้แก่ *Microbispora, Streptosporangium, Micromonospora, Nocardia, Amycolaptosis, Actinomadura, Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ด้วย รัตนาภรณ์ (2541) แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากป่าชายเลนจากตัวอย่างดิน '86 ตัวอย่างในประเทศไทย สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 14 สกุล และจากทั้งหมด 151 สายพันธุ์ มีถึง 95 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และ 27 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งยีสต์ *Candida albicans* ได้ วิเชียรและคณะ (2545) ได้ทำการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากจากดินในที่ต่าง ๆ จำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วยดินจากป่าธรรมชาติจากจังหวัดตรัง, ราชบุรี, สมุทรสาคร, สมุทรสงคราม และนครราชสีมา รวมทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ดินจากพื้นที่เกษตรกรรมจากจังหวัดตรังเป็นพื้นที่สวนยางและจากจังหวัดนครราชสีมาเป็นพื้นที่ไร่ข้าวโพด รวม 5 ตัวอย่าง และจากดินถ้ำในจังหวัดราชบุรี 3 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากด้วยวิธีการต่างกันได้ทั้งหมด 230 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกในระดับสกุลโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์พบว่ามีทั้งหมด 16 สกุล ซึ่งได้แก่ *Actinomadura* 17 สายพันธุ์ *Actinoplanes* 9 สายพันธุ์ *Amycolatopsis* 5 สายพันธุ์ *Catellatospora* 8 สายพันธุ์ *Dactylosporangium* 1 สายพันธุ์ *Herbidospora* 2 สายพันธุ์, *Kitasatosporia* 2 สายพันธุ์ *Micromonospora* 73 สายพันธุ์ *Microbispora* 7 สายพันธุ์, *Microtetraspora* 16 สายพันธุ์, *Nocardia* 36 สายพันธุ์, *Nocardiopsis* 1 สายพันธุ์, *Pseudonocardia* 2 สายพันธุ์, *Saccharomonospora* 3 สายพันธุ์, *Sacchropolyspora* 8 สายพันธุ์, *Streptosporangium* 8 สายพันธุ์ และที่จัดจำแนกไม่ได้ 35 สายพันธุ์

Chun และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาดินชายทะเลในเขต Kunsan ประเทศเกาหลี สามารถแยกได้เชื้อแอคติโนมัยสิทีสสปีชีส์ใหม่โดยให้ชื่อว่า *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov. นอกจากนี้ Li และคณะ (2003) สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทีสที่ชอบเกลือสปีชีส์ใหม่ได้จากดินเค็มในจังหวัดซินเจียง ประเทศจีน และให้ชื่อว่า *Nocardiopsis xinjiangensis* sp. nov.

การจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology จัดออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วย Nocardioforms, Actinoplanetes, Thermomonospora, Thermoactinomycetes, Maduromycetes, Streptomycetes และกลุ่ม multilocular sporangia เชื้อแอคติโนมัยสีทมีประมาณ 60 ยีนัส (Holt, และคณะ. 1994) อย่างไรก็ตาม เมื่อเร็วๆ นี้ Stackebrandt และคณะ(1997) ได้

เสนอการจัดหมวดหมู่ใหม่ของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทโดยอาศัยลักษณะการเรียงลำดับเบสของ 16s rDNA/rRNA ซึ่งได้จัดแอคติโนมัยสีท ให้อยู่ใน Class *Actinobacteria* Order *Actinomycetales* แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้ได้เสนอให้แบ่งออกเป็น 10 suborder และ 31 Family โดยกลุ่ม Thermoactinomycetes ไม่ได้จัดอยู่ในแอคติโนมัยสีท อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมัยสีทยังอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (chemotaxonomy) ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมแต่ก็ยังสามารถจำแนกชนิดหรือบอกถึงความแตกต่างได้ถึงในระดับยีนัส (Lechevalier and Lechevalier, 1967; Sykes and Skinner, 1973) ในปัจจุบันได้มีการใช้วิธี partial sequence of ribosomal RNA (gene) ช่วยในการจำแนกความต่างกันของเชื้อแอคติโนมัยสีท (Delong และคณะ, 1989; Stackebrandt และคณะ, 1991; Seki, 1994) การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งแม้จะเป็นวิธีที่อาจพ้นสมัย แต่ลักษณะนี้มีความสำคัญมากในการใช้ร่วมกับคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลในเซลล์ ชนิดของ phospholipid และชนิดของ menaquinone เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีท (Lechevalier และคณะ, 1971; Holt และคณะ, 1994) Ruan (1994,b) ได้จัดจำแนกชนิดด้วยวิธีที่รวดเร็วโดยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์บางประการ ซึ่งได้แก่ ชนิดกรดอะมิโนและน้ำตาลของเซลล์ ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับวิธี partial sequence ของ 23S ribosomal RNA ที่เป็นวิธีการ phylogenetic taxomony สำหรับการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์นั้นจำเป็นต้องอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสร้างสี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ซึ่งคุณสมบัติที่ต้องทดสอบมีทั้งหมด 139 รายการ โดยทั้งนี้มี 31 รายการที่ใช้เป็นคุณสมบัติในการจัดจำแนก (Kim,1992)

แม้จะมีการแยกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทจากธรรมชาติได้มากมายหลายพันสายพันธุ์ก็ตาม แต่ข้อมูลที่เกี่ยวกับชนิดและการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยสีทตามสภาพภูมิศาสตร์หรือนิเวศวิทยาในประเทศไทยยังมีน้อยและมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษาข้อมูลความหลากหลายของสายพันธุ์ต่าง ๆ ของแอคติโนมัยสีทและเก็บรักษาไว้ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ จึงมีความสำคัญเพราะจะเป็นการรวบรวมทรัพยากรที่มีประโยชน์ของชุมชนท้องถิ่น เพื่อนำสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ค้นพบไปประยุกต์ใช้ในค้นหาสารที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม สิ่งแวดล้อม การเกษตร การแพทย์และการสาธารณสุขต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่แยกได้ในเขตมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. เพื่อการค้นหาสายพันธุ์ที่หายากหรือสายพันธุ์ใหม่ของแอคติโนมัยสีท
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกับถิ่นอาศัย
4. เพื่อเสริมสร้างความรู้พื้นฐาน และเกิดความชำนาญในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ลักษณะของโครงการ : เป็นโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม :-

- ☐ ลักษณะการสำรวจ ศึกษา และวิจัยเพื่อการรวบรวมข้อมูล
- ☐ ลักษณะการศึกษาจากสิ่งก่อสร้าง สถาปัตยกรรม และวัฒนธรรมท้องถิ่น
- ☐ ลักษณะการเผยแพร่ เช่น การจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ ประชุม และสัมมนา

กลุ่มเป้าหมาย

การแยกและรวบรวมเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากในท้องถิ่น จึงเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญที่จะนำไปสู่ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ **(BIOACTIVE COMPOUND)** และการศึกษาวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ ต่อไป เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นการวิจัยขั้นพื้นฐาน ข้อมูลสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีทที่ได้จะมีประโยชน์แก่นักศึกษา นักวิจัย นักวิชาการที่สนใจในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพ **(BIODIVERSITY)** ควรมีการนำข้อมูลที่ได้เผยแพร่แก่ชุมชนท้องถิ่นและในวารสารวิชาการต่าง ๆ รวมทั้งการนำเสนอผลงานในที่ประชุมสัมมนาทางวิชาการ

แผนการปฏิบัติการ

1). ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย : 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2547 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2548

2). แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. การรวบรวมเอกสารและศึกษาข้อมูล	↔											
2. การเก็บตัวอย่าง		↔			↔							
3. การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์				↔				↔				
4. การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับจีนัส												
- การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์								↔				
- การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเซลล์											↔	
5. สรุปผลและจัดทำรายงานการวิจัย												↔

ขั้นตอนการดำเนินงาน

(1). การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากดิน โดยใช้พลั่วตักดิน ขุดลึกจากผิวดินลงไป 5-10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกรัดยางปากถุงให้แน่น เมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ความชื้นและพีเอช ปล่อยให้ตัวอย่างแห้งในที่ร่มและเก็บในภาชนะที่มิดชิดบดให้ละเอียดร่อนด้วยตะแกรง

(2). การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท (Isolation of actinomycetes)

แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective medium) ที่มีการเติมสารปฏิชีวะนะบางชนิด จากตัวอย่างดินที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ (treatments) ดังต่อไปนี้

วิธีที่ 1

นำดินที่แห้งมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:10 จากนั้นนำตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วมาเจือจาง 1:100 ในสารละลาย phosphate buffer (pH 7.0) ที่มี yeast extract 6% และ SDS 0.05% บ่มไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วเจือจางต่อในน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างดินที่เจือจางมาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร humic acid vitamin agar ซึ่งเติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร และ nalidixic acid 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีเฉพาะสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีททั่ว ๆ ไปโดยแบคทีเรียชนิดอื่นจะปริมาณลดน้อยมาก (Nonomura และ Hayakawa, 1988)

วิธีที่ 2

นำดินที่แห้งมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:10 จากนั้นนำตัวอย่างดินที่เจือจางแล้วมาเจือจางในสารละลายที่มี phenol 1.5% ให้มีความเจือจาง 1:100 และบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเจือจางต่อในน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างดินที่เจือจางมาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร humic acid vitamin agar ซึ่งเติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร และ nalidixic acid 20 ไมโครกรัมต่อลิตร วิธีนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทจีนัส *Micromonospora* จะเจริญได้ในสัดส่วนที่สูงมากกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa และคณะ, 1991)

วิธีที่ 3

นำดินที่แห้งมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:10 แล้วเจือจางอีก 1:100 ในสารละลาย ที่มี phenol 1.5% บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 30นาทีแล้วเจือจางต่อในน้ำกลั่น นำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร humic acid vitamin agar ซึ่งเติม cycloheximide และ nystatin 50ไมโครกรัมต่อลิตร และnalidixic acid 20 ไมโครกรัมต่อลิตร วิธีนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทจีนัส *Microbispora* จะเจริญได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa และคณะ,1991)

วิธีที่ 4

นำดินที่แห้งมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร humic acid vitaminซึ่งเติม cycloheximide และ nystatin 50ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีนี้เชื้อแอคติโนมัยสีท จีนัส *Dactylosporangium* และ *Streptosporangium* จะเจริญได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa และคณะ,1991)

(3). การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับจีนัส

3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์

ย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ISP3 ISP4 และ ISP5 (Shirling and Gottilieb, 1966) โดยวิธีขีดให้เป็นช่องตารางบนผิวของอาหารบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-3 สัปดาห์ ตรวจดูการสร้างเส้นใย, สีของโคโลนีและลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์วัตถุระยะการทำงานยาว (long working distance objective lens)

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเซลล์

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ซึ่ง ได้แก่ ชนิดของ diaminopimelic acid และชนิดของน้ำตาลโดยการไฮโดรไลซ์ เซลล์ (whole cell hydrolysate) และทำการแยกด้วยวิธี TLC chromatography เพื่อตรวจสอบชนิดของสาร (Lechevalier and Lechevalier, 1971)

ทำการจัดกลุ่มของเชื้อที่แยกได้ โดยใช้สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ ร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ซึ่งได้แก่ isomere of diaminopimelic acid และชนิดของน้ำตาลในเซลล์ ซึ่งได้แก่ไซโลส แมนโนส แรมโนส อะราบิโนส และกาแลคโตส จัดจำแนกชนิดของแอคติโนสีทที่แยกในระดับจีนัสได้ด้วยวิธีตามที่เสนอใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9thedition (Holt และ คณะ 1994) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทกับถิ่นอาศัยที่แยกมาคัดเลือกและรวบรวมสายพันธุ์กลุ่มที่ไม่ได้อยู่ในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ที่หายาก

ผลการดำเนินโครงการ

1. การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท (Isolation of actinomycetes)

จากการเก็บตัวอย่างดินภายในพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จำนวน 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินภาย นอกพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีจำนวน 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยวิธีต่าง ๆ รวมสี่วิธี สามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวนทั้งสิ้น 104 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยวิธีที่ 1 สามารถแยกเชื้อได้มากที่สุดจำนวน 81 ไอโซเลท และสามารถแยกเชื้อได้จากทุกตัวอย่าง การแยกเชื้อโดยวิธีที่ 2 สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท จากตัวอย่าง 4 ตัวอย่างใน 11 ตัวอย่าง การแยกเชื้อโดยวิธีที่ 3 สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 13 ไอโซเลท จากตัวอย่าง 6 ตัวอย่างใน 11 ตัวอย่าง สำหรับการแยกเชื้อโดยวิธีที่ 4 ไม่สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินทั้งสิบเอ็ดตัวอย่าง โดยการแยกเชื้อแต่ละวิธีเป็นวิธีการจำเพาะที่มีการทรีนเมนต์ตัวอย่างดิน เพื่อการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละชนิด ทำให้จำนวนที่ได้ในแต่ละวิธีแตกต่างกัน โดยที่การแยกเชื้อโดยวิธีที่ 1 เป็นวิธีเฉพาะสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีททั่ว ๆ ไป โดยแบคทีเรียชนิดอื่นจะปริมาณลดน้อยมาก (Nonomura and Hayakawa, 1988) สำหรับวิธีที่ 2 เหมาะสำหรับการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจีนัส *Micromonospora* เพราะสามารถเจริญได้ในสัดส่วนที่สูงมากกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa *et. al.*, 1991) วิธีที่ 3 เหมาะสำหรับการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจีนัส *Microbispora* เนื่องจากเจริญได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa *et. al.*,1991) ส่วนวิธีที่ 4 จะแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจีนัส *Dactylosporangium* และ *Streptosporangium* ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าแอคติโนมัยสีทชนิดอื่น (Hayakawa *et. al.*,1991)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ในสภาพที่เป็นกรด เนื่องจากตัวอย่างดินที่เก็บในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเป็นดินที่มีสภาพความเป็นกรดเป็นด่างต่ำหรือมีความเป็นกรดสูง คืออยู่ระหว่าง pH 4.22-6.63 ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบน

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-20 วัน พบว่าแต่ละไอโซเลทสร้างโคโลนีที่มีสีเฉพาะแตกต่างกัน และบางไอโซเลทสร้างสารสีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งตัวอย่างดิน และจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

ตัวอย่างดิน	ค่า pH	ค่าความชื้นของดิน	วิธีการแยก	รหัสเชื้อ
1. บ้านก่อ	6.80	16.34	1	PAC 1-PAC 15
			2	-
			3	PAC 16-PAC 17
			4	-
2. อาคารชีวภาพ	6.63	11.79	1	PAC 18-PAC 25
			2	PAC 26-PAC 27
			3	PAC 28
			4	-
3. ฟาร์มวัวนม	5.55	7.24	1	PAC 29-PAC 33
			2	-
			3	PAC 34-PAC 35
			4	-
4. บริเวณหนองอีเจม (ฝั่งโรงยิม)	5.28	1.62	1	PAC 36-PAC 37
			2	PAC 38
			3	PAC 39-PAC 40
			4	-
5. เรือนเพาะชำ 1 (สวนท้อ)	4.53	2.88	1	PAC 41-PAC 43
			2	-
			3	PAC 44
			4	-
6. เรือนเพาะชำ 1 (สวนมะม่วง)	4.22	7.90	1	PAC 45-PAC 55
			2	-
			3	-
			4	-
7. ป่าสัก (หน้าอาคารอธิการบดี)	4.86	6.50	1	PAC 56-PAC 59
			2	-
			3	-

ตัวอย่างดิน	ค่า pH	ค่าความชื้นของดิน	วิธีการแยก	รหัสเชื้อ
			4	-
8. บริเวณหนองน้ำ (หลังอาคารอธิการบดี)	5.00	12.60	1 2 3 4	PAC 60-PAC 63 PAC 64-PAC 66 - -
9. เรือนเพาะชำ 2 (ข้างบ่อบำบัดน้ำเสีย)	5.04	8.00	1 2 3 4	PAC 67-PAC 77 - PAC 78-PAC 82 -
10. บริเวณบ่อบำบัดน้ำเสีย	5.48	3.90	1 2 3 4	PAC 83-PAC 87 PAC 88-PAC 91 - -
11. บริเวณหนองอีเจม (ฝั่งประมง)	5.30	4.90	1 2 3 4	PAC 92-PAC 104 - - -
รวม 11 ตัวอย่าง				รวม 104 ไอโซเลท

ตารางที่ 2 ลักษณะสีของโคโลนีและการสร้างสารสีของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 เป็นเวลา 10-20 วัน

รหัสเชื้อ	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 10 วัน)	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 20 วัน)	การสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ
PAC 1	สีน้ำตาลแดง	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 2	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 3	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล	- สีน้ำตาล
PAC 4	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 5	สีขาวปนเหลือง	สีเหลืองขอบสีน้ำตาล	สีเทา
PAC 6	สีขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 7	สีขาว	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล
PAC 8	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 9	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 10	สีขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 11	สีขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 12	สีเทาปนขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 13	สีขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 14	สีน้ำตาล	สีส้ม	สีเทา
PAC 15	สีแดงปนขาว	สีเทาปนแดง	ไม่สร้าง
PAC 16	สีเหลืองปนส้ม	สีส้ม	ไม่สร้าง
PAC 17	สีเหลือง	สีดำ	ไม่สร้าง
PAC 18	สีเทาปนส้ม	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
PAC 19	สีส้ม	สีน้ำตาลแดง	ไม่สร้าง
PAC 20	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 21	สีเทาปนขาว	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 22	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 23	สีขาว	สีเทาออกเขียว	สีน้ำตาล
PAC 24	สีเทา	สีส้ม	สีเทา
PAC 25	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 26	สีเทา	สีน้ำตาลปนขาว	สีเทา

รหัสเชื้อ	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 10 วัน)	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 20 วัน)	การสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ
PAC 27	สีเทา	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล
PAC 28	สีขาว	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 29	สีเทาอ่อนออกเขียว	สีเทา	สีเหลือง
PAC 30	สีส้ม	สีเทาปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 31	สีขาว	สีเทา	สีดำ
PAC 32	สีขาว	สีเทา	สีเหลือง
PAC 33	สีขาว	สีเทาออกเขียว	สีดำ
PAC 34	สีเหลืองปนขาว	สีเทา	สีดำ
PAC 35	สีขาวปนเทา	สีเทาออกเขียว	สีดำ
PAC 36	สีขาวครีม	สีขาวครีม	สีน้ำตาล
PAC 37	สีส้ม	สีส้ม	ไม่สร้าง
PAC 38	สีเทาอ่อน	สีเทาอ่อน	สีน้ำตาล
PAC 39	สีขาวเหลือง	สีเหลือง	ไม่สร้าง
PAC 40	สีเหลือง	สีเหลือง	ไม่สร้าง
PAC 41	สีเทาออกเขียว	สีเทา	สีดำ
PAC 42	สีขาว	สีขาวขอบสีส้ม	สีน้ำตาล
PAC 43	สีขาว-เขียว	สีขาวครีม-เขียว	สีน้ำตาล
PAC 44	สีเทา	สีน้ำตาลปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 45	สีขาว-เทา	สีขาวครีม	สีน้ำตาล
PAC 46	สีขาว	สีขาว-เทา	สีน้ำตาล
PAC 47	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 48	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 49	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง-ขาว	ไม่สร้าง
PAC 50	สีเทาปนขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 51	สีเหลือง	สีเทาปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 52	สีเทาปนขาว	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล
PAC 53	สีน้ำตาลปนขาว	สีขาวครีม	สีน้ำตาล
PAC 54	สีขาว	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
PAC 55	สีเทา	สีขาวครีม	สีน้ำตาล
PAC 56	สีเทา	สีเทา-ขาว	สีน้ำตาล

รหัสเชื้อ	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 10 วัน)	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 20 วัน)	การสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ
PAC 57	สีน้ำตาลปนขาว	สีขาวครีม	สีน้ำตาล
PAC 58	สีเหลือง-ขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 59	สีขาวปนเทา	สีขาวปนเทา	สีน้ำตาล
PAC 60	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 61	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 62	สีขาว	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาล
PAC 63	สีขาว	สีขาว	ไม่สร้าง
PAC 64	สีเหลืองปนขาว	สีเทา	สีดำ
PAC 65	สีเหลืองปนขาว	สีเทา	สีดำ
PAC 66	สีขาวขุ่น	สีขาวปนน้ำตาล	ไม่สร้าง
PAC 67	สีน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง	ไม่สร้าง
PAC 68	สีเหลืองปนขาว	สีเทาปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 69	สีขาว	สีเหลืองอ่อน	สีน้ำตาล
PAC 70	สีขาวปนน้ำตาลแดง	สีน้ำตาลแดง	ไม่สร้าง
PAC 71	สีเหลืองปนขาว	สีเทา	ไม่สร้าง
PAC 72	สีเหลือง	สีขาว	ไม่สร้าง
PAC 73	สีขาว	สีเหลือง	สีน้ำตาล
PAC 74	สีส้ม	สีเทาปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 75	สีขาวปนส้ม	สีส้ม	สีน้ำตาล
PAC 76	สีเหลืองปนขาว	สีน้ำตาล	ไม่สร้าง
PAC 77	สีเหลืองปนขาว	สีขาว	ไม่สร้าง
PAC 78	สีเหลือง	สีขาว	สีเหลือง
PAC 79	สีขาวขุ่น	สีน้ำตาล	ไม่สร้าง
PAC 80	สีเหลือง	สีขาว	สีเหลือง
PAC 81	สีขาว	สีขาว	ไม่สร้าง
PAC 82	สีขาว	สีส้ม	ไม่สร้าง
PAC 83	สีขาวขุ่น	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 84	สีเหลืองปนขาว	สีน้ำตาลปนขาว	ไม่สร้าง
PAC 85	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล

รหัสเชื้อ	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 10 วัน)	สีของโคโลนี (เชื้ออายุ 20 วัน)	การสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ
PAC 86	สีเทาขาว	สีเทาขาว	สีน้ำตาล
PAC 87	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 88	สีขาวขุ่น	สีเทา	สีเหลือง
PAC 89	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีเหลือง
PAC 90	สีขาวขุ่น	สีขาว	สีเหลือง
PAC 91	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีเหลือง
PAC 92	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 93	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 94	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 95	สีขาว	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล
PAC 96	สีขาวขุ่น	สีส้ม	สีน้ำตาล
PAC 97	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 98	สีขาวขุ่น	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 99	สีน้ำตาล	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 100	สีขาว	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 101	สีขาวขุ่น	สีขาว	สีน้ำตาล
PAC 102	สีเทา	สีเทา	สีน้ำตาล
PAC 103	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีน้ำตาล
PAC 104	สีเทา	สีเทา	สีน้ำตาล

2. การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทในระดับจีนัส

2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท (Morphological Characteristic of Actinomycetes) โดยการเพาะเลี้ยงแบบ slide culture technique

ตารางที่ 3 ชนิดของเส้นใยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย	รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย
PAC 1	Substrate mycelium	PAC 53	Substrate mycelium
PAC 2	Aerial and substrate mycelium	PAC 54	Substrate mycelium
PAC 3	Substrate mycelium	PAC 55	Aerial and substrate mycelium
PAC 4	Substrate mycelium	PAC 56	Aerial and substrate mycelium

รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย	รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย
PAC 5	Substrate mycelium	PAC 57	Substrate mycelium
PAC 6	Substrate mycelium	PAC 58	Substrate mycelium
PAC 7	Aerial and substrate mycelium	PAC 59	Aerial and substrate mycelium
PAC 8	Substrate mycelium	PAC 60	Aerial and substrate mycelium
PAC 9	Aerial and substrate mycelium	PAC 61	Aerial and substrate mycelium
PAC 10	Aerial and substrate mycelium	PAC 62	Aerial and substrate mycelium
PAC 11	Aerial and substrate mycelium	PAC 63	Substrate mycelium
PAC 12	Aerial and substrate mycelium	PAC 64	Aerial and substrate mycelium
PAC 13	Aerial and substrate mycelium	PAC 65	Aerial and substrate mycelium
PAC 14	Substrate mycelium	PAC 66	Substrate mycelium
PAC 15	Aerial and substrate mycelium	PAC 67	Aerial and substrate mycelium
PAC 16	Substrate mycelium	PAC 68	Aerial and substrate mycelium
PAC 17	Aerial and substrate mycelium	PAC 69	Substrate mycelium
PAC 18	Substrate mycelium	PAC 70	Aerial and substrate mycelium
PAC 19	Substrate mycelium	PAC 71	Aerial and substrate mycelium
PAC 20	Substrate mycelium	PAC 72	Aerial and substrate mycelium
PAC 21	Aerial and substrate mycelium	PAC 73	Substrate mycelium
PAC 22	Aerial and substrate mycelium	PAC 74	Aerial and substrate mycelium
PAC 23	Aerial and substrate mycelium	PAC 75	Substrate mycelium
PAC 24	Substrate mycelium	PAC 76	Substrate mycelium
PAC 25	Substrate mycelium	PAC 77	Substrate mycelium
PAC 26	Substrate mycelium	PAC 78	Substrate mycelium
PAC 27	Substrate mycelium	PAC 79	Substrate mycelium
PAC 28	Aerial and substrate mycelium	PAC 80	Substrate mycelium
PAC 29	Substrate mycelium	PAC 81	Aerial and substrate mycelium
PAC 30	Aerial and substrate mycelium	PAC 82	Substrate mycelium
PAC 31	Aerial and substrate mycelium	PAC 83	Substrate mycelium
PAC 32	Aerial and substrate mycelium	PAC 84	Aerial and substrate mycelium
PAC 33	Aerial and substrate mycelium	PAC 85	Aerial and substrate mycelium
PAC 34	Aerial and substrate mycelium	PAC 86	Substrate mycelium
PAC 35	Aerial and substrate mycelium	PAC 87	Substrate mycelium

รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย	รหัสเชื้อ	ชนิดของเส้นใย
PAC 36	Aerial and substrate mycelium	PAC 88	Substrate mycelium
PAC 37	Substrate mycelium	PAC 89	Substrate mycelium
PAC 38	Substrate mycelium	PAC 90	Substrate mycelium
PAC 39	Substrate mycelium	PAC 91	Substrate mycelium
PAC 40	Aerial mycelium	PAC 92	Aerial and substrate mycelium
PAC 41	Aerial mycelium	PAC 93	Aerial and substrate mycelium
PAC 42	Aerial mycelium	PAC 94	Aerial and substrate mycelium
PAC 43	Aerial mycelium	PAC 95	Substrate mycelium
PAC 44	Substrate mycelium	PAC 96	Substrate mycelium
PAC 45	Substrate mycelium	PAC 97	Substrate mycelium
PAC 46	Substrate mycelium	PAC 98	Aerial and substrate mycelium
PAC 47	Substrate mycelium	PAC 99	Substrate mycelium
PAC 48	Substrate mycelium	PAC 100	Aerial and substrate mycelium
PAC 49	Substrate mycelium	PAC 101	Substrate mycelium
PAC 50	Substrate mycelium	PAC 102	Substrate mycelium
PAC 51	Substrate mycelium	PAC 103	Substrate mycelium
PAC 52	Substrate mycelium	PAC 104	Aerial and substrate mycelium

2.2 การจำแนกชนิด diaminopimelic acid (DAP) และชนิดของน้ำตาลของเซลล์

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเซลล์ของแอคติโนมัยสีทโดยการวิเคราะห์หาชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) และชนิดของน้ำตาล กลูโคส แรมโนส ไซโลส แมนโนส ไรโบส อะราบิโนสและกาแลคโตส โดย Thin Layer Chromatography (Lechevalier, 1978) พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ที่ไม่มี DAP เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ มีจำนวน 51 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มี DAP แต่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ จำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium จำนวน 16 ไอโซเลท คือ PAC10, PAC12, PAC17, PAC21, PAC36, PAC41, PAC55, PAC60, PAC61, PAC62, PAC64, PAC81, PAC84, PAC85, PAC92, PAC98 และสร้างเฉพาะ substrate mycelium จำนวน 25 ไอโซเลท คือ PAC1, PAC4, PAC5, PAC6, PAC8, PAC14, PAC26, PAC29, PAC37, PAC44, PAC45, PAC49, PAC50, PAC51, PAC66, PAC75, PAC77, PAC78, PAC79, PAC80, PAC82, PAC88, PAC89, PAC91, PAC99 ดังแสดงในตารางที่ 4 ตามพื้นฐานการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่ไม่มี DAP เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้างมัยซีเลียมเป็นแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ จัดอยู่ในสกุล *Promicromonospora* และแอคติโนมัยสีทที่ไม่มี DAP

เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้างมัยซีเลียมเป็นแบบ substrate mycelium จัดอยู่ในสกุล *Oerskovia* หรือ *Jonesia* ดังนั้นจึงจัดแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ไม่มี DAP แต่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium ทั้งหมด 16 ไอโซเลท อยู่ในสกุล *Promicromonospora* และจัดจัดแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ไม่มี DAP แต่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้างเฉพาะsubstrate mycelium จำนวน 25 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Oerskovia* หรือ *Jonesia* ตามลำดับ

สำหรับแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ที่ไม่มี DAP และไม่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium จำนวน 6 ไอโซเลท คือ PAC2, PAC15, PAC33, PAC43, PAC59, PAC67 และสร้างเฉพาะsubstrate mycelium จำนวน 4 ไอโซเลท คือ PAC16, PAC20, PAC24, PAC57 ดังแสดงในตารางที่ 5 ยังไม่สามารถจำแนกสกุลได้ เนื่องจากต้องจำแนกด้วยน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมคือน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลมาดูโลส ตามพื้นฐานการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 ถ้ามีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ จัดในสกุล *Actinoplanes* หรือถ้ามีน้ำตาลมาดูโลสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ จัดในสกุล *Actinomadura*

ส่วนแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ที่มี L-DAP เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ มีจำนวน 48 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่สร้าง aerial และ substrate mycelium จำนวน 25 ไอโซเลท คือ PAC7, PAC9, PAC11, PAC13, PAC22, PAC23, PAC28, PAC30, PAC31, PAC32, PAC34, PAC35, PAC40, PAC42, PAC56, PAC65, PAC68, PAC70, PAC71, PAC72, PAC74, PAC93, PAC94, PAC100, PAC104 ดังแสดงในตารางที่ 4 จึงจัดกลุ่มนี้ตามพื้นฐานการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่มี L-DAP เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้าง aerial และ substrate mycelium จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* หรือ *Nocardioides* หรือ *Kitasatospora* สำหรับกลุ่มที่สร้างเฉพาะ substrate mycelium คือ PAC18, PAC19, PAC25, PAC27, PAC38, PAC39, PAC46, PAC47, PAC48, PAC52, PAC53, PAC54, PAC63, PAC69, PAC73, PAC76, PAC83, PAC86, PAC87, PAC96, PAC97, PAC101, PAC103 ดังแสดงในตารางที่ 4 จึงจัดกลุ่มนี้ตามพื้นฐานการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่มี L-DAP เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ และสร้างเฉพาะ substrate mycelium อยู่ในสกุล *Terrabacter* หรือ *Intrasporangium*

สำหรับแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ที่มี Meso-DAP และมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ สร้าง aerial และ substrate mycelium มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ PAC90 ดังแสดงในตารางที่ 4 จึงจัดกลุ่มนี้ตามพื้นฐานการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่มี Meso-DAP และมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ สร้าง aerial และ substrate mycelium จัดอยู่ในสกุล *Kitasatosporia* เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีในการจัดจำแนก จะสามารถบอกถึงความแตกต่างของสกุลได้มากขึ้น ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ชนิดของ DAP น้ำตาลและลักษณะของเส้นใยของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

ชนิดของ DAP	ชนิดของน้ำตาล	ลักษณะของเส้นใย	รหัสเชื้อ	สกุลแอคติโนมัยสีท
No DAP	galactose	Aerial and substrate	PAC10, PAC12, PAC17, PAC21, PAC36, PAC41, PAC55, PAC60, PAC61, PAC62, PAC64, PAC81, PAC84, PAC85, PAC92, PAC98	*Promicromonospora* spp.
		Substrate	PAC1, PAC4, PAC5, PAC6, PAC8, PAC14, PAC26, PAC29, PAC37, PAC44, PAC45, PAC49, PAC50, PAC51, PAC66, PAC75, PAC77, PAC78, PAC79, PAC80, PAC82, PAC88, PAC89, PAC91, PAC99	*Oerskovia* spp. หรือ *Jonesia* spp.
	No galactose	Aerial and substrate	PAC2, PAC15, PAC33, PAC43, PAC59, PAC67	Unidentified genus
		Substrate	PAC16, PAC20, PAC24, PAC57	Unidentified genus
L-DAP	NA	Aerial and substrate	PAC7, PAC9, PAC11, PAC13, PAC22, PAC23, PAC28, PAC30, PAC31, PAC32, PAC34, PAC35, PAC40, PAC42, PAC56, PAC65, PAC68, PAC70, PAC71, PAC72, PAC74, PAC93, PAC94, PAC100, PAC104	*Streptomyces* spp. หรือ *Nocardioides* spp. หรือ *Kitasatospora* spp.
	NA	Substrate	PAC18, PAC19, PAC25, PAC27, PAC38, PAC39, PAC46, PAC47, PAC48,	*Terrabacter* spp. หรือ *Intrasporangium* spp.

ชนิดของ DAP	ชนิดของน้ำตาล	ลักษณะของเส้นใย	รหัสเชื้อ	สกุลแอคติโนมัยสีท
			PAC52, PAC53, PAC54, PAC63, PAC69, PAC73, PAC76, PAC83, PAC86, PAC87, PAC96, PAC97, PAC101, PAC103	
Meso-DAP	galactose	Aerial, substrate	PAC90	*Kitasatosporia* sp.

หมายเหตุ NA, not applicable; เชื้อรหัส PAC3, PAC58, PAC95 และ PAC102 ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 5 ชนิดของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีในการจัดจำแนก

รหัสเชื้อ	สกุลแอคติโนมัยสีท
PAC10, PAC12, PAC17, PAC21, PAC36, PAC41, PAC55, PAC60, PAC62, PAC64, PAC81, PAC92, PAC98	*Promicromonospora* spp.
PAC61, PAC84, PAC85, PAC15, PAC24, PAC33	*Actinomadura* spp.
PAC1, PAC4, PAC5, PAC6, PAC8, PAC14, PAC26, PAC29, PAC37, PAC44, PAC45, PAC49, PAC50, PAC51, PAC66, PAC75, PAC77, PAC78, PAC79, PAC80, PAC82, PAC88, PAC89, PAC91, PAC99	*Oerskovia* spp. หรือ *Jonesia* spp.
PAC2, PAC16, PAC20, PAC43, PAC57, PAC59, PAC67	Unidentified genus
PAC7, PAC11, PAC13, PAC22, PAC23, PAC34, PAC40, PAC42, PAC56, PAC71, PAC100	*Nocardioides* spp.
PAC9, PAC28, PAC30, PAC31, PAC32, PAC35, PAC65, PAC68, PAC70, PAC72, PAC74, PAC93, PAC94, PAC104	*Streptomyces* spp.
PAC19, PAC25, PAC27, PAC38, PAC39, PAC46, PAC47, PAC48, PAC52, PAC53, PAC54, PAC63, PAC73, PAC76, PAC83, PAC86, PAC87, PAC96, PAC97, PAC101, PAC103	*Terrabacter* spp.
PAC18, PAC69	*Intrasporangium* spp.
PAC90	*Kitasatosporia* sp.

สรุปค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานโครงการฯ

งบประมาณที่ได้รับการจัดสรร		117,000	บาท
1. ค่าตอบแทน		3,000	บาท
2. ค่าใช้สอย	37,000	บาท	
3. ค่าวัสดุ		76,989.40	บาท
รวมงบประมาณที่ใช้จริง		116,989.40	บาท
คงเหลือคืนคลัง		10.60	บาท

สรุปผลการดำเนินโครงการและข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยนี้ เป็นการเก็บรวบรวมข้อมูลเบื้องต้น เกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทภายในเขตมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณเรือนเพาะชำ ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ดินจากบริเวณหนองน้ำและป่าโปร่ง มาทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินรวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ด้วยการทรีตเมนต์ตัวอย่างและคัดแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สารเคมีแตกต่างกันรวม 4 วิธี เพื่อให้ได้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความหลากหลายมากขึ้น จากการทดลองสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งสิ้น 104 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบเคมีภายในเซลล์ สามารถจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้อยู่ในสกุล *Oerskovia* spp. และ *Jonesia* spp. 25 สายพันธุ์, *Terrabacter* spp., 21 สายพันธุ์ *Streptomyces* spp. 14 สายพันธุ์, *Promicromonospora* spp. 13 สายพันธุ์, *Nocardioides* spp. 11 สายพันธุ์ *Actinomadura* spp. 6 สายพันธุ์, *Intrasporangium* spp. 2 สายพันธุ์ *Kitasatosporia* sp. 1 สายพันธุ์ และที่จัดจำแนกไม่ได้ 11 สายพันธุ์ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มีความหลากหลายเฉพาะกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่เป็นกรด และยังไม่สามารถตรวจหาแอคติโนมัยสีทที่หายากได้ เนื่องจากดินในเขตมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และไม่มีความแตกต่างของสภาพอากาศ ซึ่งการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ควรใช้พื้นที่ที่มีความแตกต่างของสภาพดินและสภาพทางภูมิศาสตร์ Alexander (1961) รายงานว่าปริมาณและความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินขึ้นอยู่กับชนิด ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน คุณสมบัติทางกายภาพและปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน โดยทั่วไปในดินที่มีสภาพเป็นด่างและแห้ง จะพบแอคติโนมัยสีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงถึง 95 เปอร์เซนต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแอคติโนมัยสีทจะลดลงในดินที่สภาพเป็นกรดและดินที่เปียกชื้น จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินของมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ในเขตพื้นที่ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพอากาศ พบว่าในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้นมีความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีทมากกว่าเขตอบอุ่นที่เป็นบนภูเขาและบริเวณที่มีหิมะปกคลุม และพบว่าดินในป่าจะมีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทมากกว่าเขตที่ทำการเกษตร ส่วนบริเวณที่แห้งแล้งและมีความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง จำนวนแอคติโนมัยสีทจะลดลงด้วย (Xu and Jiang, 1996) นอกจากนี้ Hayakawa และคณะ (1988) รายงานว่าการกระจายตัวของแอคติโนมัยสีทชนิดที่หายากขึ้นอยู่กับชนิดของดิน ปริมาณฮิวมัส ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน และลักษณะของกรดฮิวมิก ดินที่มี

การเพาะปลูกซึ่งมีปริมาณฮิวมัสสูงและมีค่าพีเอช ประมาณ 6.5.-7.0 มีปริมาณแอคติโนมัยสีทสูงสุด ส่วนในดินที่เป็นกรด (pH 5.0-6.5) และมีปริมาณฮิวมัสสูงจะ พบจีนัส *Microbiospora* และ *Streptosporangium* มากที่สุด ส่วน *Saccharomonospora* พบมากในดินที่เป็นด่าง (pH 7.0-7.5) และปริมาณฮิวมัสต่ำ

กล่าวได้ว่าในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างของสภาพภูมิศาสตร์ มีอุทยานและวนอุทยานของชาติหลายแห่ง ทำให้มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแอคติโนมัยสีท ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในพืชและสัตว์ การยับยั้งการเจริญของไวรัสและเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้การดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีใช้กันในปัจจุบัน จึงเป็นปัญหาหนึ่งที่ต้องทำการค้นคว้าวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสีท นอกจากจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความหลากหลายและการแพร่กระจายของเชื้อแอคติโนมัยสีทในเขตชุมชนท้องถิ่นแล้ว คุณสมบัติบางประการที่ตรวจพบ เช่นการเจริญในสภาพที่เป็นกรดและความสามารถในการสร้างสารที่สกัดจากเซลล์ จะเป็นแนวทางที่จะนำสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่คัดแยกได้ไปศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม การเกษตร สิ่งแวดล้อม การแพทย์และการสาธารณสุขต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค -ไม่มี-

บรรณานุกรม

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541 . การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6: 23-33

วิเชียร กิจปรีชาวนิช และชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล 2544 รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เสนอต่อ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เรื่อง การแยกและรวบรวมสายพันธุ์หายากจากดิน

Alexander, M. 1961. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc.

Athaley, M, and Lacey, J. 1981. Selective isolation and enumeration of Actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51:289-297.

Cross, T. 1968. Thermophile actinomycetes. *J. of Appl. Baeteriol.* 12 : 115-130.

Chun, J., K. S. Bae, E. Y. Moon, S-O. Jung, H. K. Lee and S-J. Kim. 2000. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1909-1931.

Delong, E. F., Wickham, G. S., and Pace N. R. 1989. Phylogenetic strains : ribosomal RNA-based probes for identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.

Hatano, K. 1997 Actinomycete population in mangrove rhizospheres. *IFO Res. Commun.* 18: 26-31.

Hayakawa, M., Ishizawa, K., and Nonomura, H. 1988. Distribution of rare actinomycetes in japanese soils. *J. Ferment. Technol.* 66: 367-373.

Hayakawa, M., Nonomura, T., and Nonomura, H. 1991(a). New methods for the highly selective Isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 320-326.

Hayakawa, M., Kajiura, T. and Nonomura, H. 1991(b). New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangivm* and *Dectylosporangium* from soil. *J. of Ferment and Bioeng.* 72: 327-333.

Hayakawa, M., Momose. Y., Yamasaki. T. and Nonomura H. 1996. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four spored actinomycete. *J. of Appl. Bacteriol.* 80: 375-386.

Holt, J. G. Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (eds) 1994. Bergey's of Determinative Bacteriology. 9th edition. Baltimore. Williams & Wilkins.

Iwai, Y. and Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compound. pp 281-302. In Omura, S. (ed). The search for bioactive compounds from microorganisms. Spring-Verlag. New York.

Khan, M. R., Williams, S. T. 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry* 7: 345-348.

Kim, J. Chang. 1992. Isolation and screening of actinomycetes from natural environment. In UNESCO Regional Training Workshop on Exploitation of Novol Microorganisms, Especially Actinomycetes. Taedox Science Town, Taejon, Replulic of Korea, Aug.24-Sept.2.

Kitpreechavanich V., Kampee, T., and Kudo, T. 1997. A preliminary study on the biodiversity of actinomycetes from soil in Huai Kha Khaeng wild life sanctuary. p. 125. Abs. in The 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 19-22, Nakbonratchasima, Thailand.

Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. 1967. Biology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 21: 71-100.

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

Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K and Kudo, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1761-1767.

Nonomura, H. and Hayakawa, M. 1988. New Methods for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. 286-296.

Ruan, J. S. 1994(a). Rapid Isolation and Identification of actinomycetes . In. UNESCO Southeast

Asia Regional Training Workshop "Rapid Methods in Microbiology and Biotechnology" Dept of Microbiology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. October, 19-28.

Ruan, J. S. 1994(b). Taxonomy and Identification Actinomycetes. In UNESCO Southeast Asia. Regional Training Workshop on Rapid Methods in Microbiology and Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok,Thailand. October. 19-28.

Singleton, P. and D. Sainsbury, 1997. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York.

Srivibool, R. 1997. A collection of actinomycetes from Mangrove soils and screening for antimicrobial producing strains. p. 131. Abs. presented in The 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Nakhonratchasima, Thailand. November 19-22.

Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R., and Liesack, W. 1991. Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide Probles. *Appl. and Environ. Microbiology*. 1468-1471.

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.

Seki, T. 1994. Phylogenetic Taxonomy of *Streptomyces* Using 16 S Ribosomal RNA : An application for Rapid Identification of Streptomycetes by PCR. Lecture note in UNESCO Southeast Asia Regional Workshop on Rapid Methods in Microbiology and Biotechnology. Dept. of Microbiology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. October, 19 - 28.

Sykes, G., Skinner, F. A. (eds) 1973. Actinomycetes : Chracteristics and practical importance. Academic Press London.

Williams, W.,Williams, S. T., Vickers, J. C. 1988. Detection of Actinomycetes in the Natural Environment : Problems and Perspectives. In Y. Okami *et. al.* Biology of Actinomycetes'88. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp.265-270.

Wang, Y., Ruan, J., Zhang, Z. and Wang, Y. 1999. High actinomycete diversity in the tropical rainforests in Singapore.p.35. Abs. in Symposium on Microbial diversity: The Asian scence. Feb 22-24, National university of Singapore, Singapore.

Xu, L.H. , Jiang C. L. 1996. Investigations on actinomycete population and resources in some areas in Yunnan : Actinomycete population in southeastern Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*. 36: 48-52.