รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. การแยกแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวกในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2546

ภาษาอังกฤษ

Anderson, A.S. and Wellington, E.M. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51(3):797-814.

Angelova, L., Dalgalarrondo, M., Minkov, I., Danova, S., Kirilov, N., Serkedjieva, J., Chobert, J.M., Haertle, T. and Ivanova, I. 2006. Purification and characterisation of a protease inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* 34-1 with an antiviral activity. *Biochim Biophys Acta*. 1760(8):1210-6.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol*. 39(5):425-30.

Cao, L., Xie, L., Xue, X., Tan, H., Liu, Y. and Zhou, S. 2007. Purification and characterization of alginate lyase from *streptomyces* species strain A5 isolated from banana rhizosphere. *J Agric Food Chem*. 55(13):5113-7.

Charan, R.D., Schlingmann, G., Bernan, V.S., Feng, X. and Carter, G.T. 2005. Additional pyrrolomycins from cultures of Streptomyces fumanus.*J Nat Prod*. 68(2):277-9.

Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiol*. 17(4):840–862

Cook, A.E. and Meyers, P.R. 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Microbiol*. 53(6):1907-15.

Coombs, J. T. and Franco, C.M. M. 2003. Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. *Appl Environ Microbiol*. 69(7):4260–4262.

Cooper J.E., and Feil E.J., 2004. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol* .12: 373–393.

Conn, V.M. and Franco, C.M. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum L.*) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol*. 70(3):1787-94.

Dalphin, J.C., Pernet, D., Reboux, G., Martinez, J., Dubiez, A., Barale, T. and Depierre, A. 1991. Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France. *Throx*. 46(9):619-23.

Darwish, A.M. and Ismaiel, A.A. Genetic diversity of Flavobacterium columnare examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. *Mol Cell Probes*. 2005. 19(4):267-74.

Davelos Baines, A.L., Xiao, K. and Kinkel, L.L. 2007.Lack of correspondence between genetic and phenotypic groups amongst soil-borne streptomycetes. *FEMS Microbiol Ecol*. 59(3):564-75.

Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condron, M.A., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B. and Yaver, D. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*. 150(4):785-93

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameur-Mehdi, R., Mellouli, L.and Laatsch, H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res Microbiol.* 156(3):341-7.

Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. and Rainey, F.A. 1997. Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacers. *Int J Syst Bacteriol*. 47(1):202-6.

Hatano. K , Nishii, T. and Kasai, H. 2003. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly Streptoverticillium) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol*. 53(5):1519-29.

Hiraki J., Ichikawa T., Ninomiya S., Seki H., Uohama K., Seki H., Kimura S., Yanagimoto Y. and Barnett J.W. Jr. 2003. Use of ADME studies to confirm the safety of ε-polylysine as a preservative in food. *Regul Toxicol Pharmacol.* 37(2):328-40.

Huang,Y., Li, W., Wang, L., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C., Liu, Z., Swings, J. and Goodfellow, M. 2004. *Streptomyces glauciniger* sp. nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(6):2085-9.

Igarashi, M., Kinoshita, N., Ikeda, T., Kameda, M., Hamada, M. and Takeuchi, T. 1997. Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J Antibiot* . 50(12):1020-5.

Kaneko, T., Takahashi, S. and Saito, K. 2000. Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp., and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener (HFCS) production. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64(5):940-7.

Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T.and Yoshida, T. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 151(2):249-55.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. *General introduction to actinomycete biology*, p. 2-33. In Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich.

Kim, H.J., Lee, S.C. and Hwang, B.K. 2006. *Streptomyces cheonanensis* sp. nov., a novel streptomycete with antifungal activity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(2):471-5

Kirby, R. and Rybicki, E. P. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a means of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. *J Gen Microbiol.* 132(7):1891-1894.

Labeda, D.P. and Lyons, A.J. 1992. DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl Environ Microbiol.* 58(2):532-5.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M.C., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. and Swings, J. 2005. Grouping of *Streptomycetes* using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Res Microbiol.* 156 (5-6):755-62.

Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. 1970 .Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* . 20:435-443.

Li, W., Lanoot, B., Zhang, Y., Vancanneyt, M., Swings, J. and Liu, Z. 2002. *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigiate spore chains. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52(5):1629-33.

Macherla, V.R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Nicholson, B., Lam, K.S. and Potts, B.C. 2005. Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod*. 68(5):780-3.

Martín, M.C., Manteca, A., Castillo, M.L., Vázquez, F. and Méndez, F.J. 2004. *Streptomyces albus* isolated from a human actinomycetoma and characterized by molecular techniques. *J Clin Microbiol*. 42(12):5957-60.

McDonald, W.L., Fry, B.N., and Deighton, M.A. 2005. Identification of Streptococcus spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet Microbiol*. 2005 .20;111(3-4):241-6.

Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. p.122 and 189, Asakura Publishing, Japan.

Nikolakopoulou, T.L., Egan, S., van Overbeek, L.S., Guillaume, G., Heuer, H., Wellington, E.M., van Elsas, J.D., Collard, J.M., Smalla, K. and Karagouni, A.D. 2005. PCR detection of oxytetracycline resistance genes *otr*(A) and *otr*(B) in tetracycline-resistant streptomycete isolates from diverse habitats. *Curr Microbiol*. (4):211-6.

Ninawe, S. and Kuhad, R.C. 2005. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. *J Appl Microbiol*. 99(5):1141-8

Noel, R. K., John, G. and Holt, D.H. 1983. Bergey Bergey's manual of systematic bacteriology 1st ed. Williams & Wilkins. Baltimore.

Ochi, K. 1995. A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int J Syst Bacteriol*. 45(4):507-514.

Park, H.S.and Kilbane, J.J. 2006. Rapid detection and high-resolution discrimination of the genus *Streptomyces* based on 16S-23S rDNA spacer region and denaturing gradient gel electrophoresis.*J Ind Microbiol Biotechnol*.33(4):289-97.

Pfaller, M.A. 2006. Flavophospholipol use in animals: positive implications for antimicrobial resistance based on its microbiologic properties. *Diagn Microbiol Infect Dis*.56(2):115-21.

Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prévost, H. and Dousset, X. 2004. Identification of Carnobacterium species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl Environ Microbiol.* 70(8):4468-77.

Redenbach, M.,Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P. and Cullum, J. 1993. The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol Gen Genet.* 241(3-4):255-62.

Reese, R. E., Betts, R. F. and Gumustop, B. 2000. Handbook of antibiotics. 3 rd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.

Rhee, K.H. 2002. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. *J Gen Appl Microbiol.* 48(6):321-7.

Rintala, H. 2003. Streptomycetes in indoor environments-PCR based detection and diversity. Doctor thesis. Environmental Sciences Program. University of Kuopio. Finland

Saddler, G. S., O'Donnell, A. G., Goodfellow,M. and Minnikin, D. E.1987. SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids. *J Gen Microbiol* 133, 1137-1147.

Sahin, E. 2005. Antimicrobial activity of *Streptomyces* species against mushroom blotch disease pathogen. *Basic Microbiol.* 45(1):64-71.

Sahin, N. 2004. Isolation and characterization of mesophilic, oxalate-degrading Streptomyces from plant rhizosphere and forest soils. *Naturwissenschaften.* 91(10):498-502.

Sanglier, J.J., Whitehead, D., Saddler, G.S., Ferguson, E.V. and Goodfellow, M. 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene.*115(1-2):235-42.

Sato T., Matsuyama J., Takahashi N., Sato M., Johnson J., Schachtele C., Hoshino E., 1998. Differentiation of oral Actinomyces species by 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Arch Oral Biol.* Mar;43(3):247-52.

Schwartz, D., Berger, S., Heinzelmann, E., Muschko, K., Welzel, K., and Wohlleben, W. 2004. Biosynthetic Gene Cluster of the Herbicide Phosphinothricin Tripeptide

from *Streptomyces viridochromogenes* Tu¨494. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7093–7102

Song, J., Lee, S.C., Kang, J.W., Baek, H.J. and Suh, J.W. 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(1):203-9.

Syed, D.G., Agasar, D., Kim, C.J., Li, W.J., Lee, J.C., Park, D.J., Xu, L.H., Tian, X.P. and Jiang, C.L. 2007. *Streptomyces tritolerans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek.* Original paper.

Taechowisan, T., Tuntiwachwuttikul, P., Lu, C., Shen, Y., Lumyong, S. and Taylor, W.C. 2007. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Immunol Invest.*36(2):203-11.

Tanabe, T., Morinaga, K., Fukamizo, T. and Mitsutomi, M. 2003. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(2):354-64.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. and Bhole, B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces? *Arch Microbiol.* 176(5):386-90.

Wellington, E. M. H. and Williams, S. T. 1981. Host ranges of phages isolated to *Streptomyces* and other genera. *Zentbl Bakteriol Hyg I Abt Suppl.* 11:93-98.

Wenner, T., Roth, V., Decaris, B. and Leblond, P. 2002. Intragenomic and intraspecific polymorphism of the 16S-23S rDNA internally transcribed sequences of *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology.* 148(3):633-42.

Xu, L.H., Jiang, Y., Li, W.J., Wen, M.L., Li, M.G. and Jiang, C.L. 2005. *Streptomyces roseoalbus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil in Yunnan, China. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 87(3):189-94.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งฮิวมิกเอซิดวิตามิน (Humic acid vitamin agar)

1. กรดฮิวมิก	1	กรัม
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
3. วุ้นผง (agar)	15	กรัม
4. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ฆ่าเชื้อแบบมาตราฐาน

5. วิตามินบี (B-Vitamins) ประกอบด้วย

- ไทเอมีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
- ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.5	มิลลิกรัม
- ไพริดอกซิน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxin-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
- แคลเซียม แพนโททะเนต (Calcium pantotanate)	0.5	มิลลิกรัม
- อิโนซิทอล (Inositol)	0.5	มิลลิกรัม
- กรดอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acod)	0.5	มิลลิกรัม
- ไบโอติน (Biotin)	0.25	มิลลิกรัม
6. ไซโคลเฮกซะมีด (Cyclohexamide)	50	มิลลิกรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

หมายเหตุ

1. ละลายกรดฮิวมิค ในสารละลาย 0.2 N NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง
2. วิตามินบี (B-Vitamins) และไซโคลเฮกซะมีด (Cyclohexamide) ฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองเติมลงไปในอาหารภายหลังการฆ่าเชื้อมาตรฐาน

2. อาหารแข็ง (SY medium)

1. เอนเซดเอมีน (N-Z amine)	1	กรัม
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
3. แป้ง (Starch)	10	กรัม
4. วุ้นผง (agar)	15	กรัม
5. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

3. อาหารแข็งเบนเนต (Bennett agar medium)

1. กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
3. เปปโตน (Peptone)	2	กรัม
4. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1	กรัม
5. ไซโคลเฮกซะมีด (Cyclohexamide)	50	มิลลิกรัม
6. วุ้นผง (agar)	18	กรัม
7. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

4. อาหารแข็งแมนนิทอล ซอยบีน (Mannitol Soybean Agar Medium, MS medium)

1. ถั่วเขียวบด	20	กรัม
2. วุ้นผง (agar)	18	กรัม
3. น้ำกลั่น (distilled water)	500	มิลลิลิตร
4. น้ำประปา (tap water)	500	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และ 9.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

5. อาหารแข็งทดสอบการย่อย อะดินีน กวานีน ไฮโปแซนทีน และ ไซแลน

1. กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม
3. เปปโตน (Peptone)	2	กรัม
4. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1	กรัม
5. ไซโคลเฮกซะมีด (Cyclohexamide)	50	มิลลิกรัม
6. วุ้นผง (agar)	18	กรัม
7. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

8. อะดินีน (Adenine) กวานีน (Guanine) ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) และ ไซแลน (Xylan)

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที หมายเหตุ 0.5% อะดินีน 0.1%กวานีน 0.4%ไฮโปแซนทีน และ 0.4%ไซแลน แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมลงไป ในอาหารภายหลังการฆ่าเชื้อมาตรฐาน

6. อาหารเหลว C4 (C4 medium)

1. แป้ง (Starch)	10	กรัม
2. ยีสต์ขนมปัง (Dry yeast)	4	กรัม
3. ถั่วเขียวบด	25	กรัม
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2	กรัม
5. กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
6. 20 % สารละลายสารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1	มิลลิลิตร
7. 5 % สารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	มิลลิลิตร
8. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

7. อาหารแข็งไทโรซีน (Tyrosine agar)

1. กลีเซอรอล (Glycerol)	15	กรัม
2. แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	0.5	กรัม
3. แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine)	1	กรัม
4. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัม
5. เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
6. Trace salt	1	มิลลิลิตร
7. วุ้นผง (agar)	20	กรัม

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

หมายเหตุ Trace salt ประกอบด้วย

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร

8. อาหารทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

1. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2.64	กรัม
2. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.38	กรัม
3. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4.3H_2O$)	5.65	กรัม
4. แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$)	1	กรัม
5. Trace element	1	

มิลลิลิตร

6. น้ำตาล (L-arabinose, Rhamnose, Raffinose หรือ Sucrose)

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

หมายเหตุ1. Trace element ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.064	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.011	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.079	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.015	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร

2. น้ำตาล (L-arabinose, Rhamnose, Raffinose หรือ Sucrose) เตรียม stock น้ำตาลแต่ละชนิด 20 % ฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรอง

9. อาหารแข็งมูลเลอร์-ฮิลตัน (Mueller-Hinton agar)

1. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	2	กรัม
2. Acid Casien Hydrolysate	17.5	กรัม
3. แป้ง (Starch)	1.5	กรัม
4. วุ้นผง (Agar)	17	กรัม
5. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

10. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar

1. มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
2. กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
3. วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
4. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

11. อาหารแข็ง Sabouraud Agar

1. Bactopeptone	10	กรัม
2. กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
3. วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
4. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

12. อาหารเหลว GYM

1. กลูโคส (Glucose)	4	กรัม
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4	กรัม
3. สารสกัดจากมอล์ต (Malt extract)	10	กรัม
4. น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

ภาคผนวก ข
บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

1.1 สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4

ชั่งทริส-เบส Trismabase ($C_4H_{11}NO_3$) 121.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโรคลอลิกเข้มข้น รอให้เย็นแล้วจึงปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.3 สารละลาย NaCl เข้มข้น 5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย EDTA เข้มข้น 5 โมลาร์ พีเอช 8.0

ชั่ง EDTA 186.1 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าคาวามเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.5 สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TE

ผสมสารละลาย 1 M Tris-HCl pH 7.4 และ สารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0 ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.6 สารละลายบัฟเฟอร์ SET

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สารละลาย EDTA เข้มข้น 5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ สารละลาย NaCl เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

1.7 สารละลาย RNaseA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง RNaseA 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.8 สารละลาย 3 M Sodium acetate

ชั่งโซเดียมอะซีเตท กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร มิลลิลิตร

2. บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซีส

2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 50X TAE

ทริส-เบส (Trisma base)	242	กรัม
กรดอะซิติก	57.1	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 5 โมลาร์ พีเอช 8.0	100	มิลลิลิตร

ละลายทุกส่วนในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2.2 อะกาโรสเข้มข้น 1%

อะกาโรส (Agarose)	1.0	กรัม
สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE	100	มิลลิลิตร

2.3 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในน้ำ

ชั่งเอธิเดียมโบรไมด์และละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

3. บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับทำโพลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟลิซีส

3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 5X TBE

ทริส-เบส (Trisma base)	54	กรัม
กรดบอริก	27.5	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 5 โมลาร์ พีเอช 8.0	20	มิลลิลิตร

ละลายทุกส่วนในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.2 โพลิอะคลิลาไมด์เจลเข้มข้น 8%

น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	5.93	มิลลิลิตร
5X TBE	2	มิลลิลิตร
40% Acrylamide plus 1% N,N'-methylenebisacrylamide	2	มิลลิลิตร
10% Ammonium Persulfate	70	ไมโครลิลิตร
TEMED	3.5	ไมโครลิลิตร

3.3 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในน้ำ

ชั่งเอธิเดียมโบรไมด์และละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

4. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Buffer EB

QIAquick Column

ก่อนใช้ชุดสกัดครั้งแรกให้เติมเอทานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

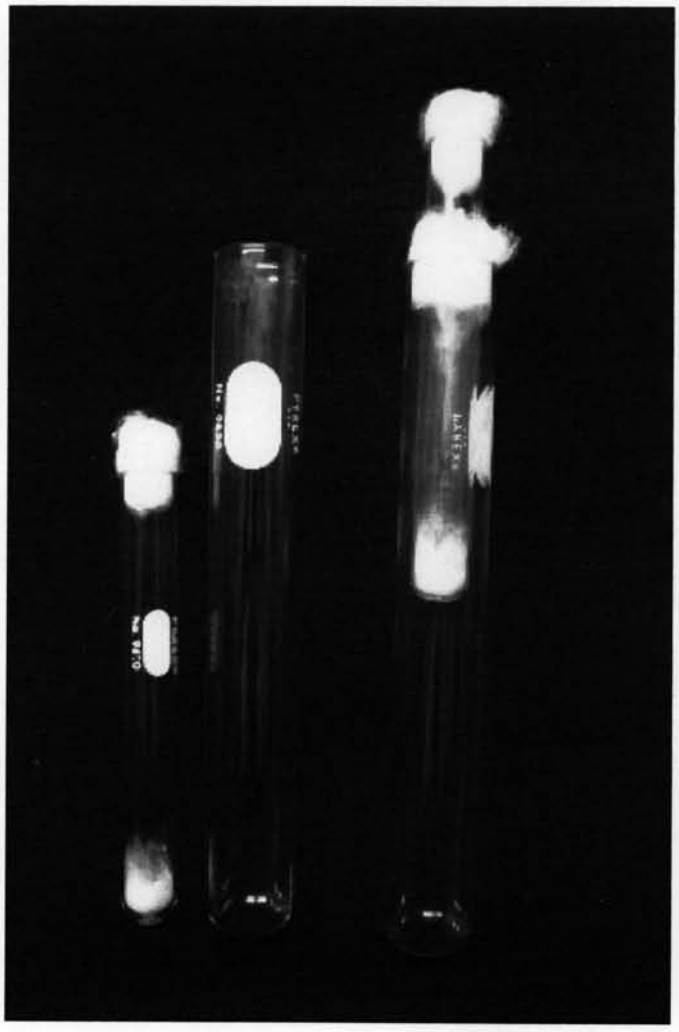
5. สารปฏิชีวนะ

5.1 สเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 นีสแตตินความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

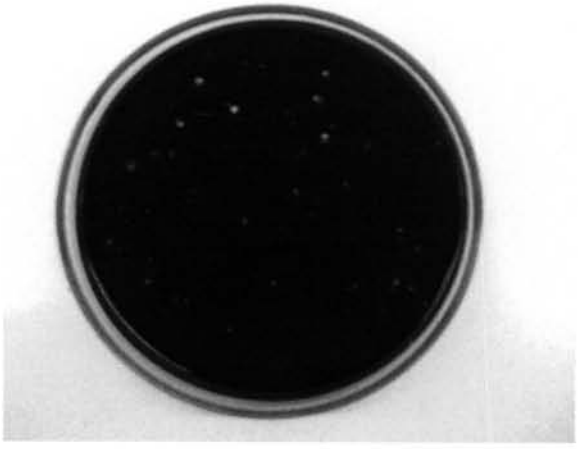
5.3 ไซโคลเฮกซาไมด์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง



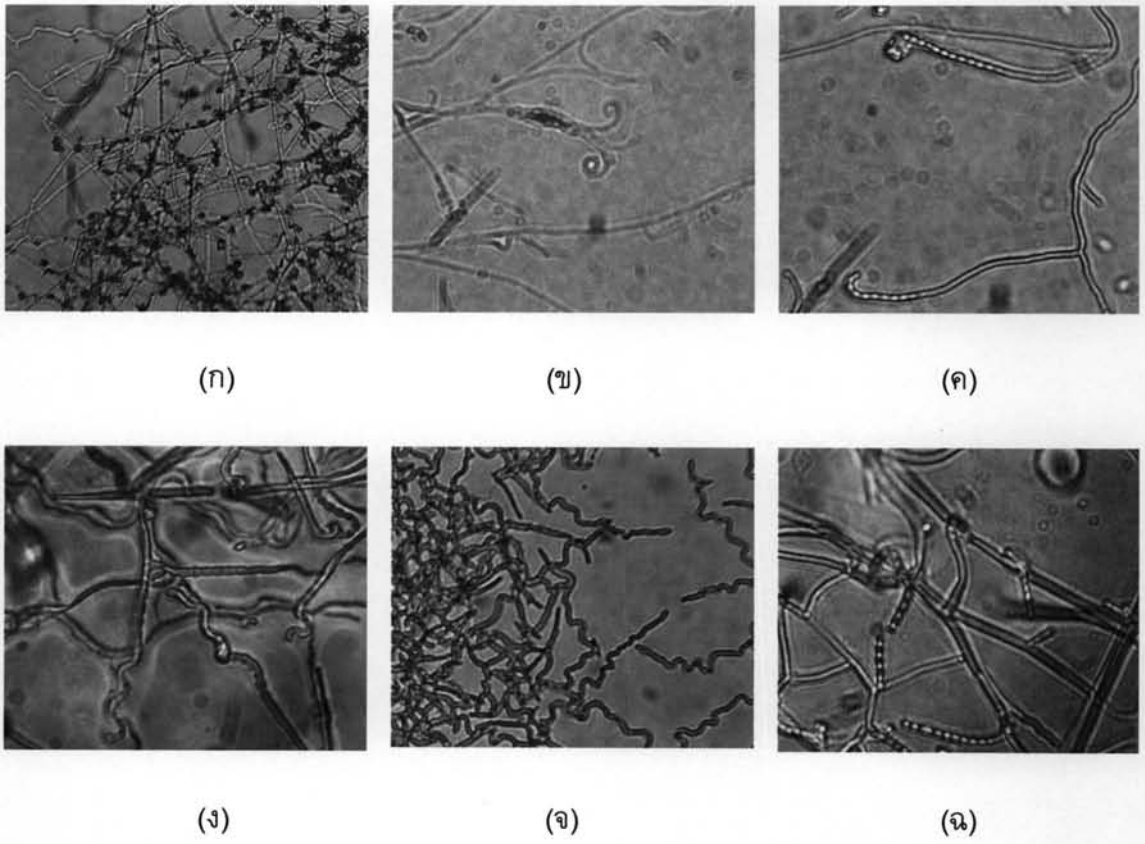
รูปที่ ค.1 ชุดกรองสปอร์

ภาคผนวก ง
ภาพผลการทดลอง



รูปที่ ง.1 การเจริญของโคโลนี *Streptomyces* บนอาหารแข็งฮิวมิกเอซิดวิตามิน

รูปที่ ง.2 การเก็บสปอร์แขวนลอยของ Streptomyces ใน 30% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็น culture collection



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

รูปที่ ง.4 ลักษณะสายใยสปอร์

(ก) สายสปอร์ปลายโค้งแบบวงกลม (Retinaculum Apertum Atypical Typical: RATS)

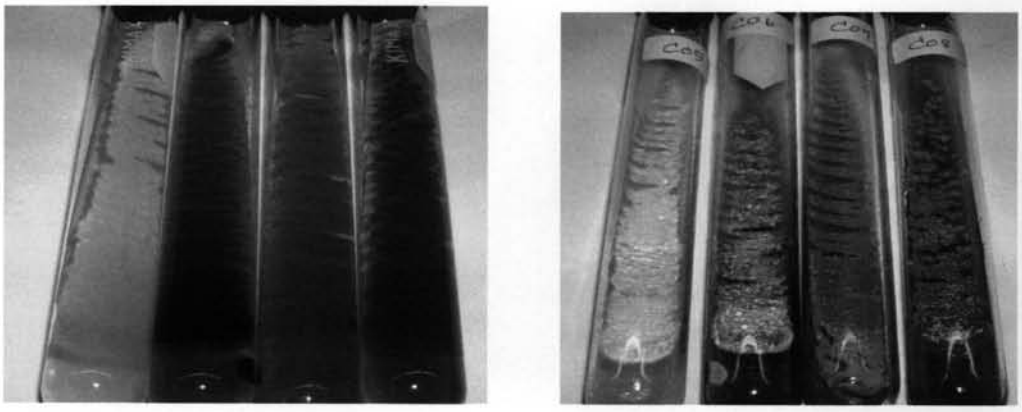
(ข) สายสปอร์ปลายโค้งแบบตะขอขนาดใหญ่ (Retinaculum Apertum Atypical Large: RAAL)

(ค) สายสปอร์ปลายโค้งแบบตะขอขนาดเล็ก (Retinaculum Apertum Atypical Small: RASS)

(ง) สายสปอร์เป็นเกลียว (Spiral&Coil: SC)

(จ) สายสปอร์มีลักษณะโค้งงอเล็กน้อย (Rectus Flexibilis Flexuous: RFF)

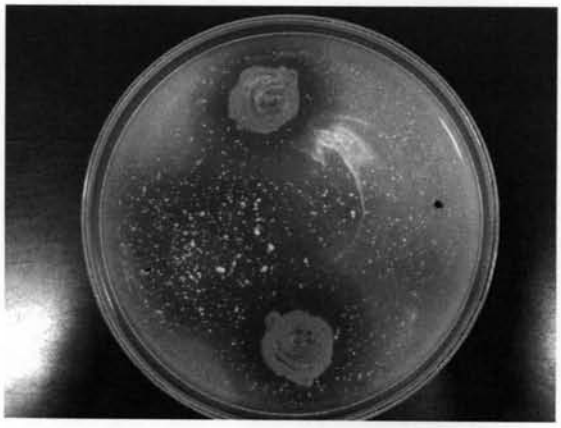
(ฉ) สายสปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง (Rectus Flexibilis Straight: RFS)



(ก) (ข)

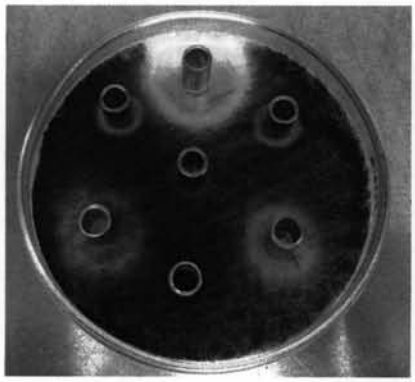
รูปที่ ง.5 การสร้างรงควัตถุของสปอร์ (ก) และรงควัตถุที่แทรกซึมในอาหาร (ข)

รูปที่ ง.6 การเจริญในอาหารเพื่อทดสอบการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานิน

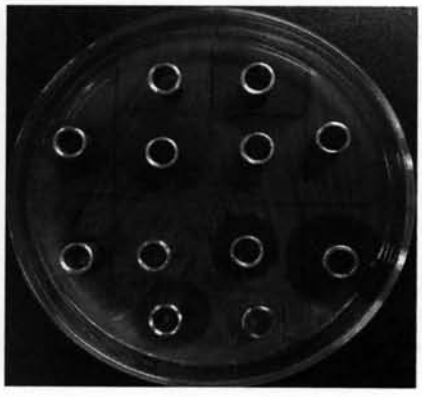


รูปที่ ง.7 การเจริญบนอาหารการทดสอบการย่อยซับสเตรท

(ก)



(ข)



(ค)

(ง)

รูปที่ ง.8 การสร้างบริเวณใสบนอาหารการทดสอบการสร้างสารต้านจุลชีพ

(ก) *Candida albicans* ATTC 70014

(ข) *Aspergillus niger* ATTC 6275

(ค) *Staphylococcus aureus* ATTC 25923

(ง) *Escherichia coli* ATTC 25922

ตารางที่ ง.1 ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomyces* spp. 30 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

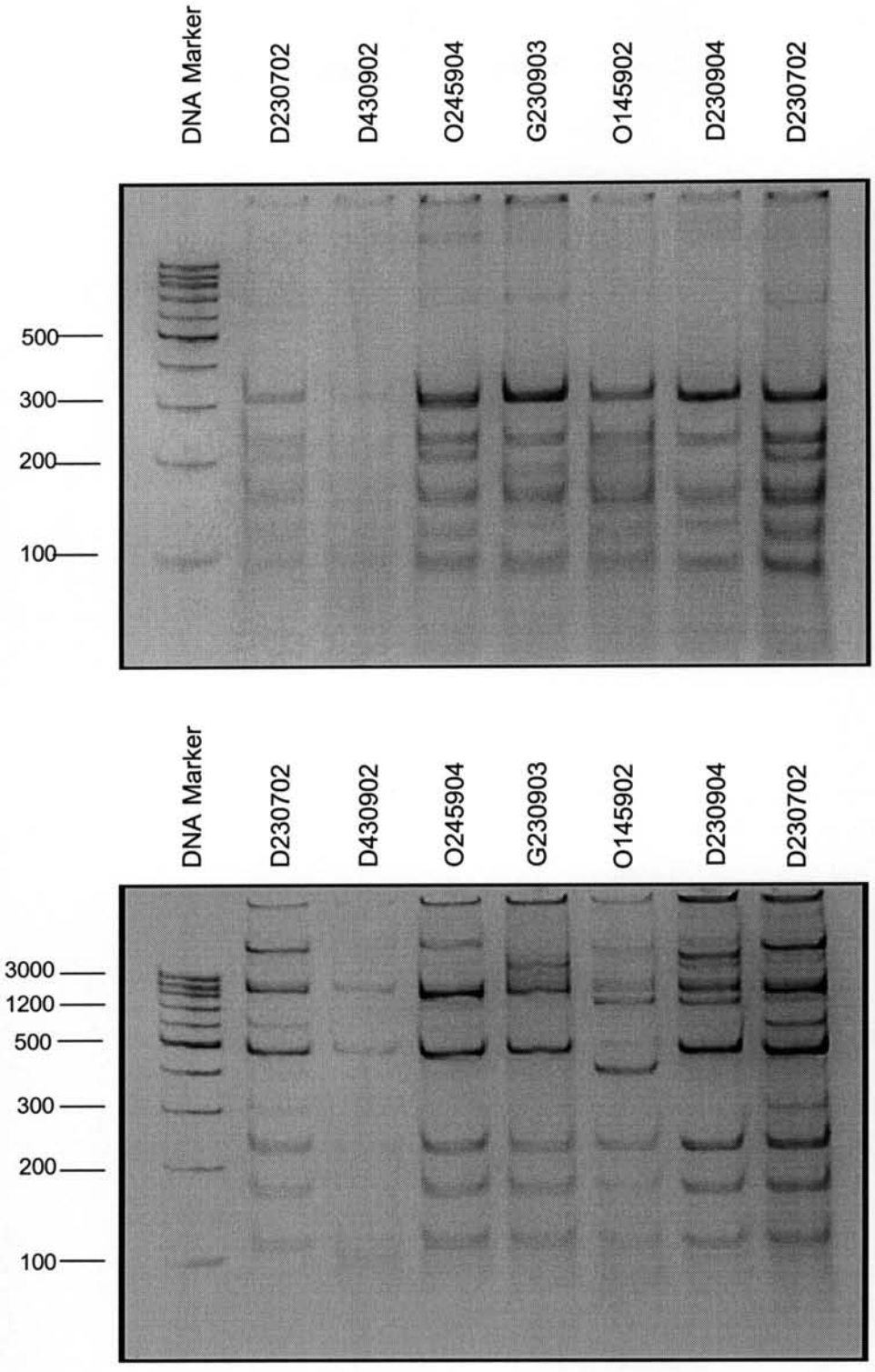
ไอโซเลต	Accession Number	ข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank	Query coverage	Max identity
D530703	AY183358	*Amycolatosis lexingtonensis* NRRL B-24131	99%	98%
G230706	AF052390	*Amycolatopsis thermoflava* N1165	100%	99%
DC30709	AJ556157	*Nocardia puris gene* strain IFM 0583	99%	94%
O145702	DQ449953	*Streptomyces bingchengensis* 226541	99%	99%
D245707	AB184489	*Streptomyces tosaensis* NBRC 13798	99%	98%
O145902	X79322	*Streptomyces glaucescens* DSM 40716	99%	98%
O130903	AB184424	*Streptomyces lusitanus* NBRC 13464	99%	99%
G145708	EF178696	*Streptomyces minutiscleroticus* NRRL B-12202	100%	99%
O230704	EF626598	*Streptomyces rochei* strain NRRL B-1559	100%	99%
O130706	AB184540	*Streptomyces malachiticus* subsp. griseospinosus NBRC 13871	100%	99%
D230903	DQ442541	*Streptomyces pseudogriseolus* strain NRRL B-3288T	99%	100%
O145701	AB184573	*Streptomyces fulvoviolaceus* NBRC 14148	99%	99%
D230701	AB245393	*Streptomyces ginsengisoli* Gsoil 025	98%	99%
O245706	AY999905	*Streptomyces bungoensis* strain NRRL B-24305	99%	99%
D230704	AB184512	*Streptomyces roseochromogenus* subsp. albocyclini NBRC 13828	99%	99%

ตารางที่ ง.1 ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomyces* spp. 30 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (ต่อ)

ไอโซเลต	Accession Number	ข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank	Query coverage	Max identity
O245704	AB184845	*Streptomyces lanatus* NBRC 12787	99%	100%
O145903	AB184484	*Streptomyces roseochromogenus* subsp. albocyclini NBRC 13828	99%	99%
D245908	AB184425	*Streptomyces albolongus* NBRC 13465	99%	99%
D730901	AB184725	*Streptomyces hygroscopicus* subsp.limoneus NBRC 16557	99%	100%
D130908	AB184725	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. limoneus NBRC 16557	100%	99%
O245906	EF063474	*Streptomyces hygroscopicus* strain 579(1)-2	99%	99%
G230705	X79853	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. limoneus ATCC 21431	100%	99%
O145708	AB184798	*Streptomyces rameus* NBRC 3782	99%	99%
D145706	AB184503	*Streptomyces diastatochromogenes* subsp. luteus NBRC 13814	99%	98%
D230904	AB184534	Streptomyces spinichromogenes NBRC 13856	99%	99%
D845703	AB184696	*Streptomyces bungoensis* NBRC 15711	99%	99%
O130708	AY999905	*Streptomyces bungoensis* NRRL B-24305	99%	99%
O230706	AF346484	*Streptomyces tumescens* strain OTP-3-1	100%	99%
D245701	AB184385	*Streptomyces capoamus* NBRC 13411	100%	99%
D530902	AB184533	*Streptomyces misawanensis* NBRC 13855	99%	98%

ตารางที่ ง.2 แสดงข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Streptomyces* และ *Amycolatopsis*

Accessions number	**ข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank**
AB245393	*Streptomyces ginsengisoli* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:Gsoil 025
DQ442541	*Streptomyces pseudogriseolus* strain NRRL B-3288T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AB184534	*Streptomyces spinichromogenes* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13856
AB184489	*Streptomyces tosaensis* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13798
AB184425	*Streptomyces albolongus* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13465
AB184267	*Streptomyces corchorusii* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13032
EF178696	*Streptomyces minutiscleroticus* strain NRRL B-12202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY999905	*Streptomyces bungoensis* strain NRRL B-24305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ449953	*Streptomyces bingchengensis* strain 226541 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF063474	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. limoneus partial 16S rRNA gene, strain ATCC 21431
AB184512	*Streptomyces roseochromogenus* subsp. albocyclini gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13828
AB184843	*Streptomyces glaucescens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12774



รูปที่ ง.9 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP ด้วยโพลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟลิซีสของไอโซเลต *Streptomyces*

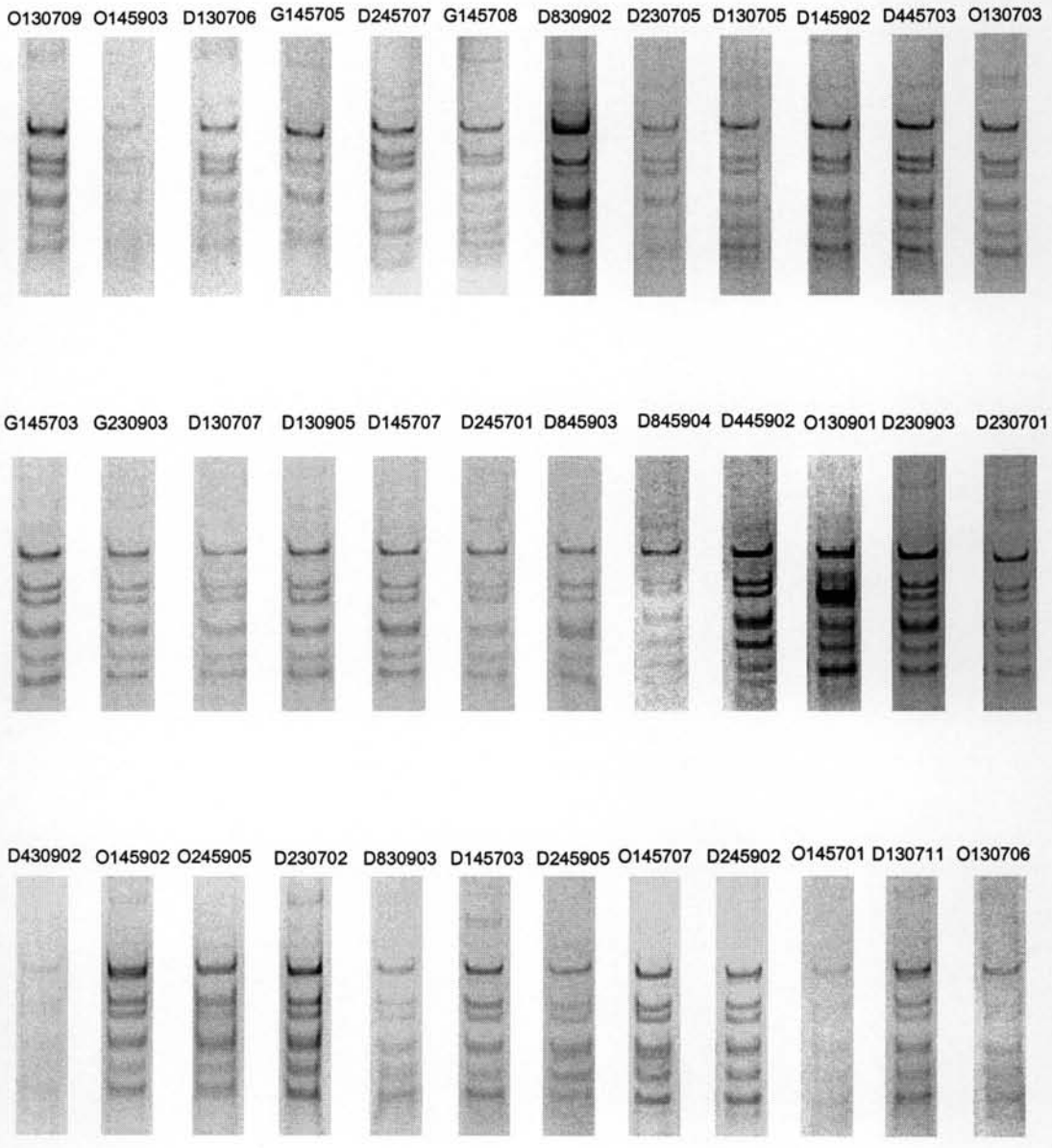
(ก) ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

(ข) ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI

ภาคผนวก จ
การจัดกลุ่มด้วยลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

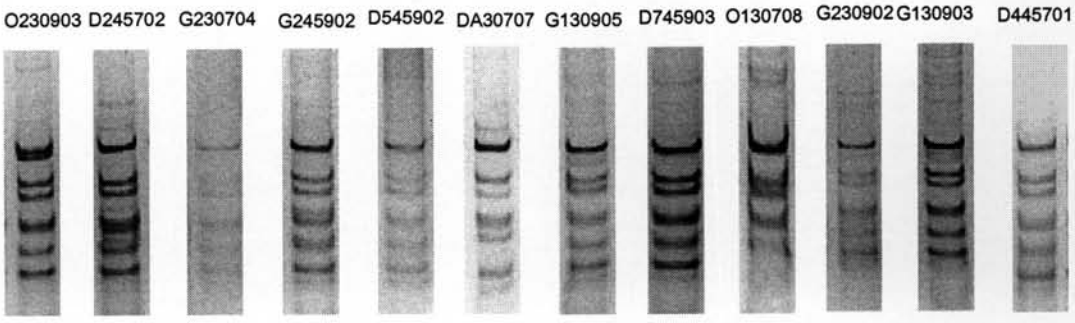
รูปที่ จ.1 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

กลุ่มที่ 1

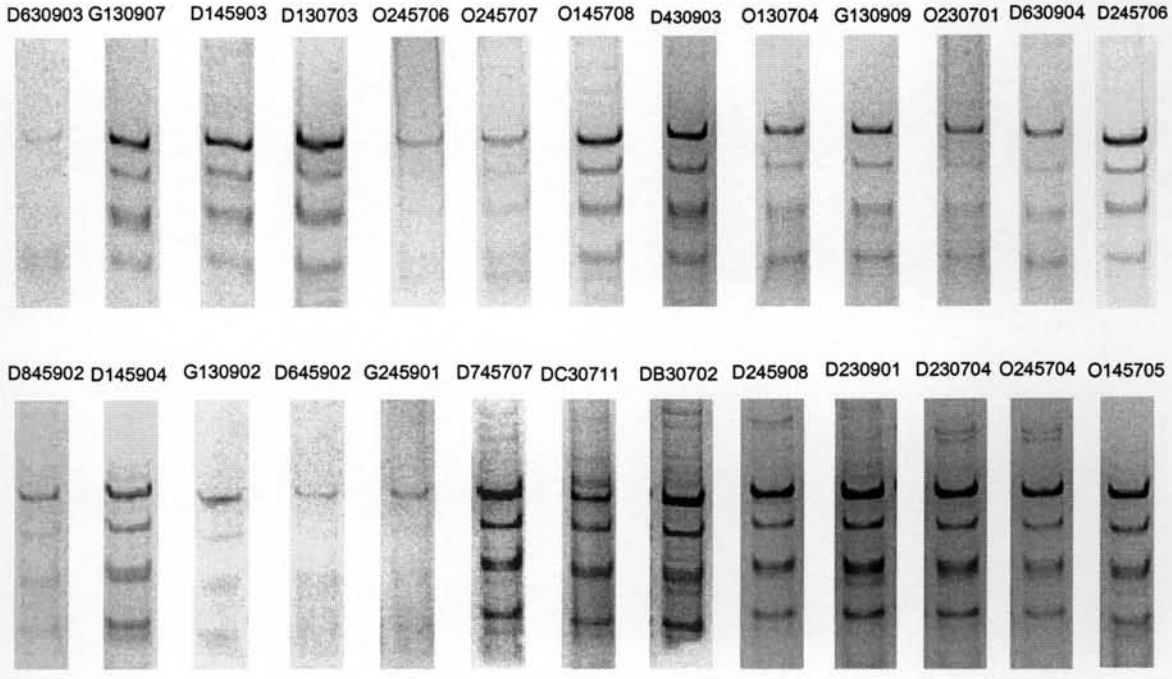


รูปที่ จ.1 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

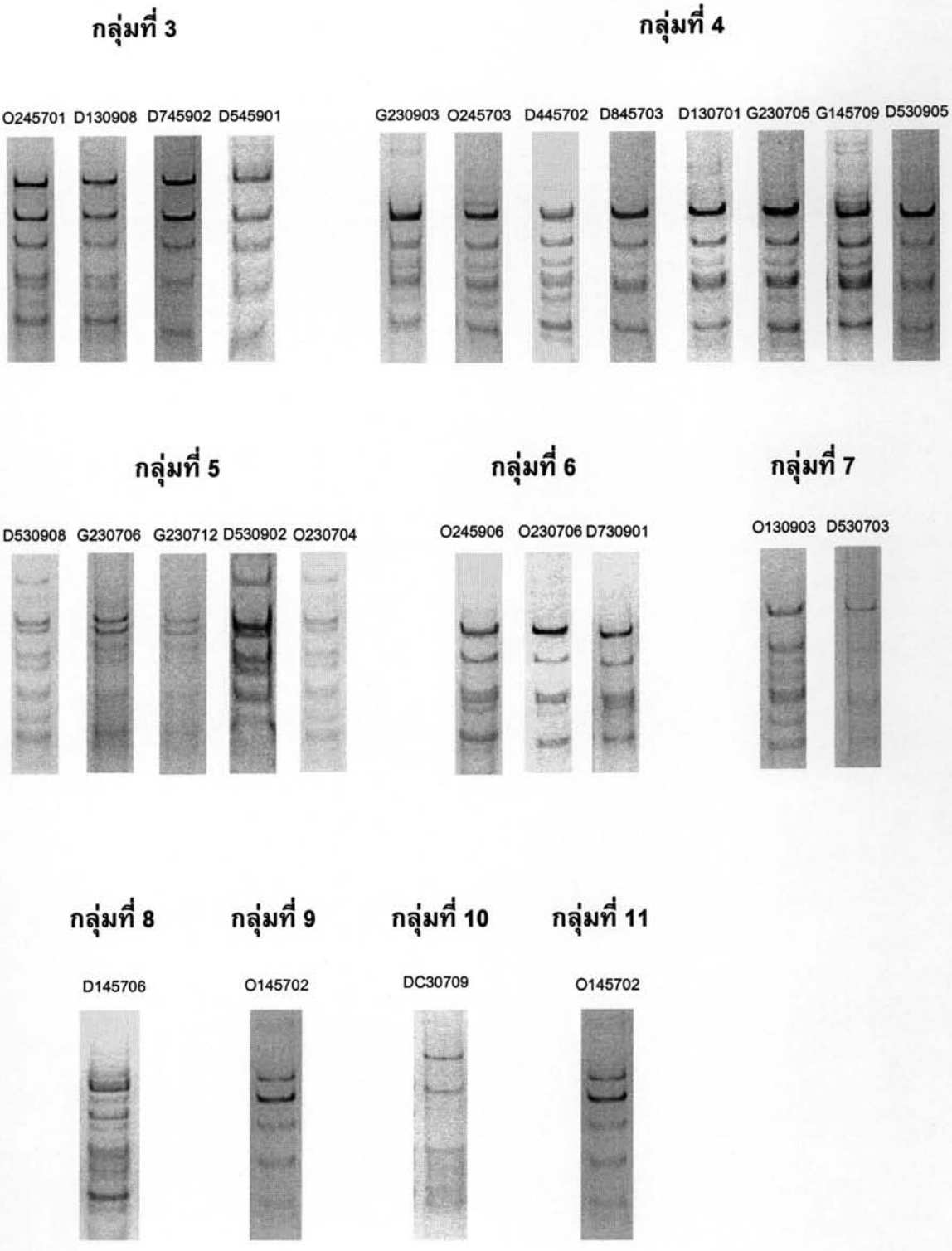
กลุ่มที่ 1 (ต่อ)



กลุ่มที่ 2

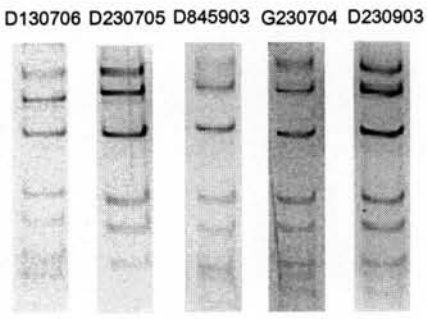


รูปที่ จ.1 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

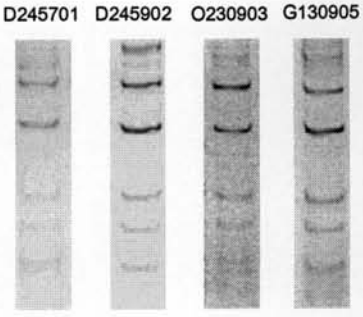


รูปที่ จ.2 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI

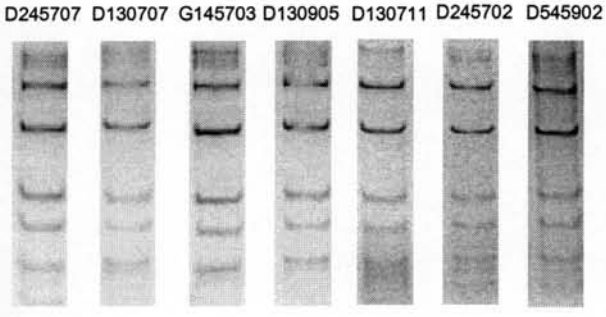
กลุ่มที่ 1/1



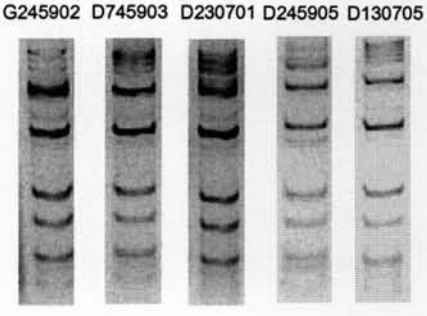
กลุ่มที่ 1/2



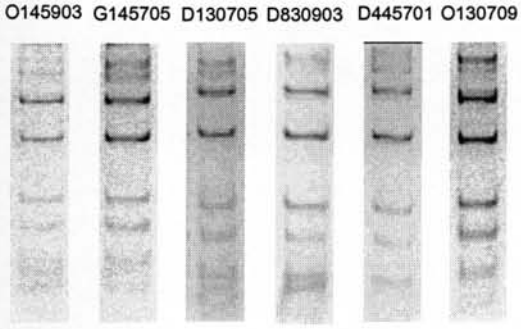
กลุ่มที่ 1/3



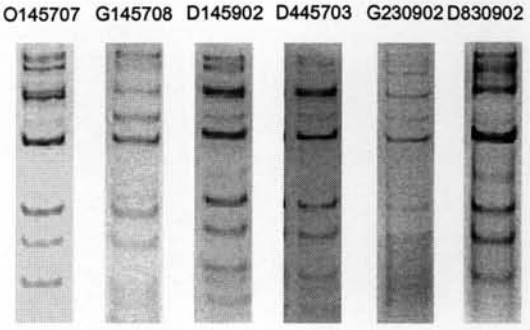
กลุ่มที่ 1/4



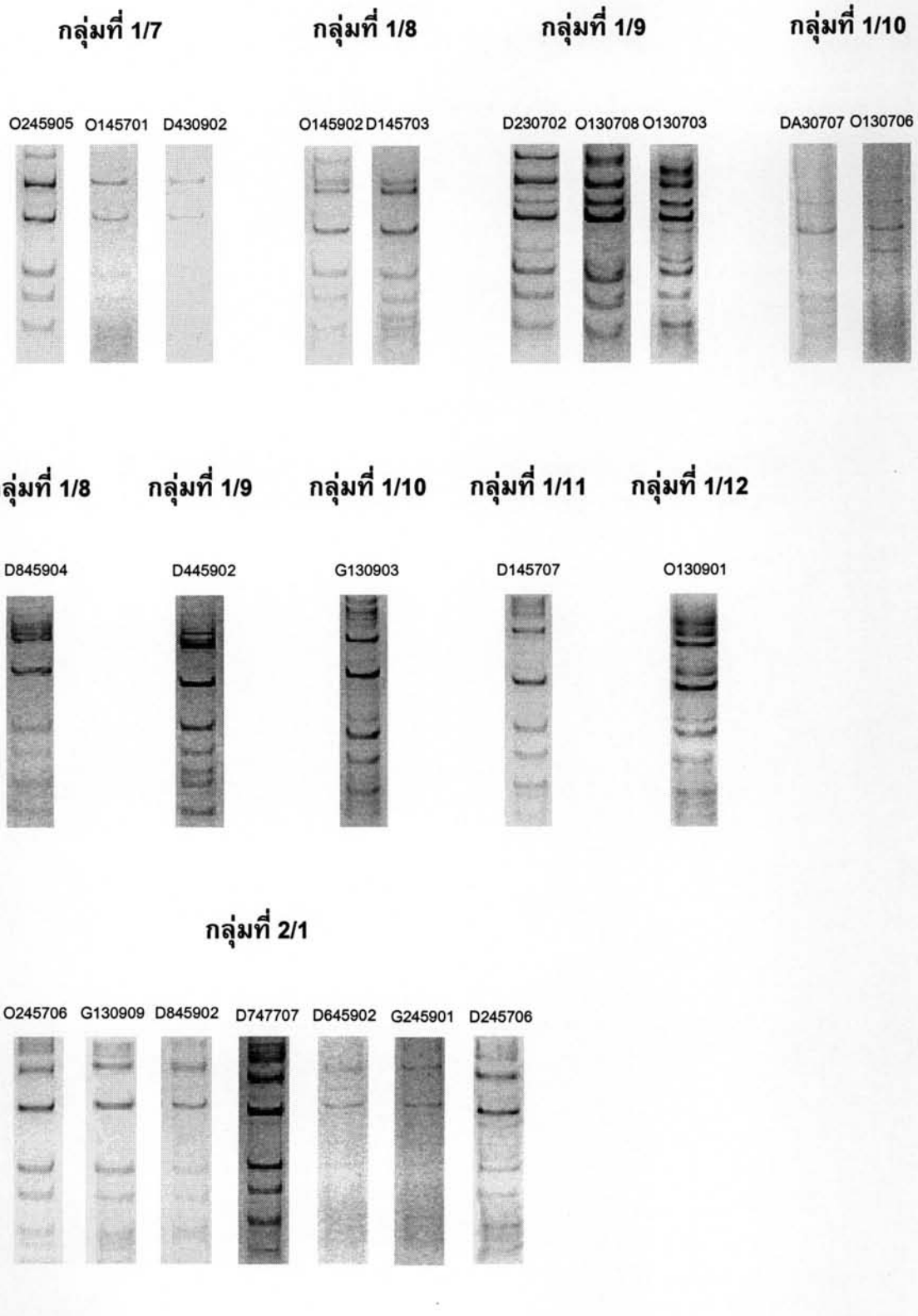
กลุ่มที่ 1/5



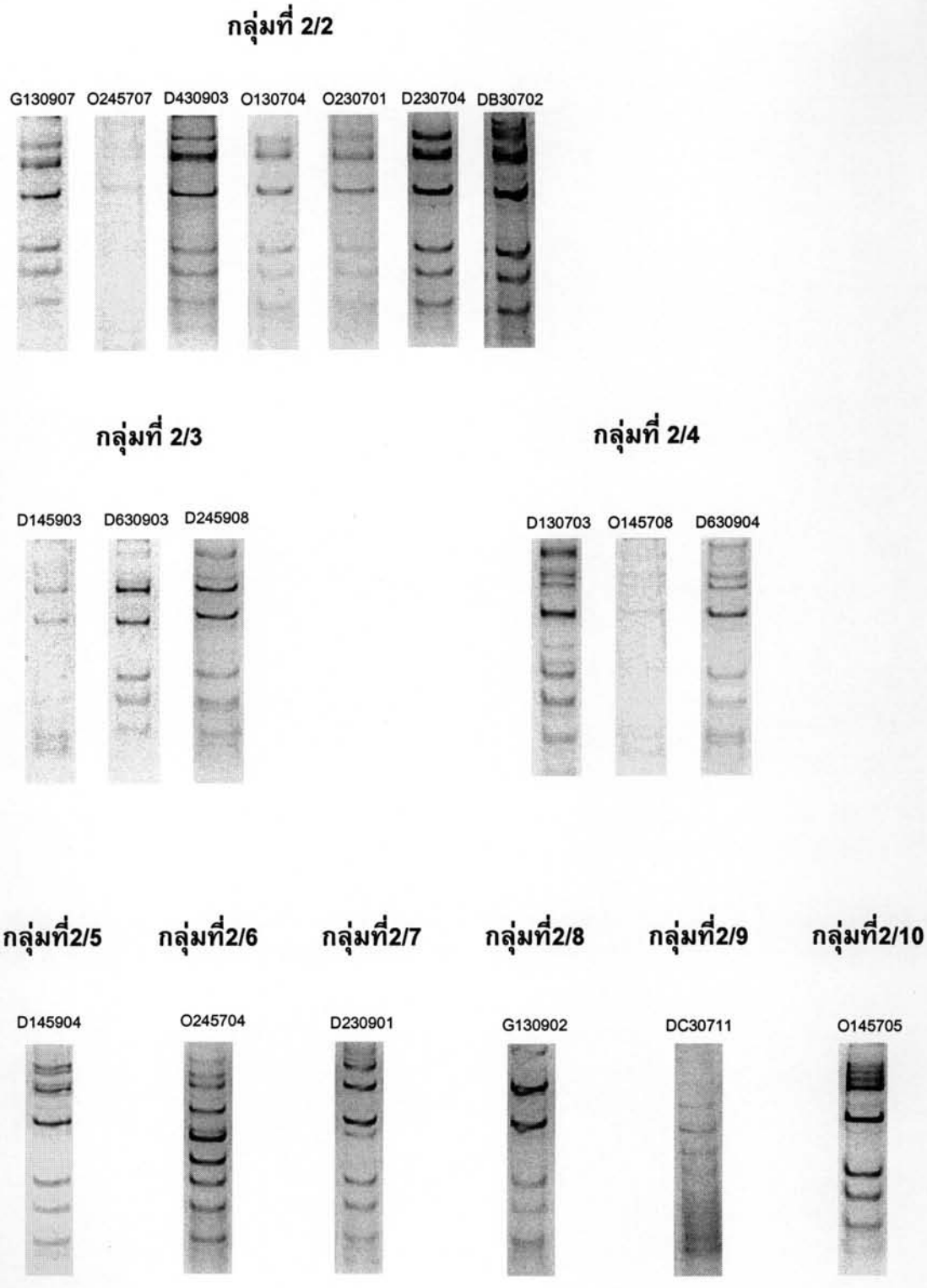
กลุ่มที่ 1/6



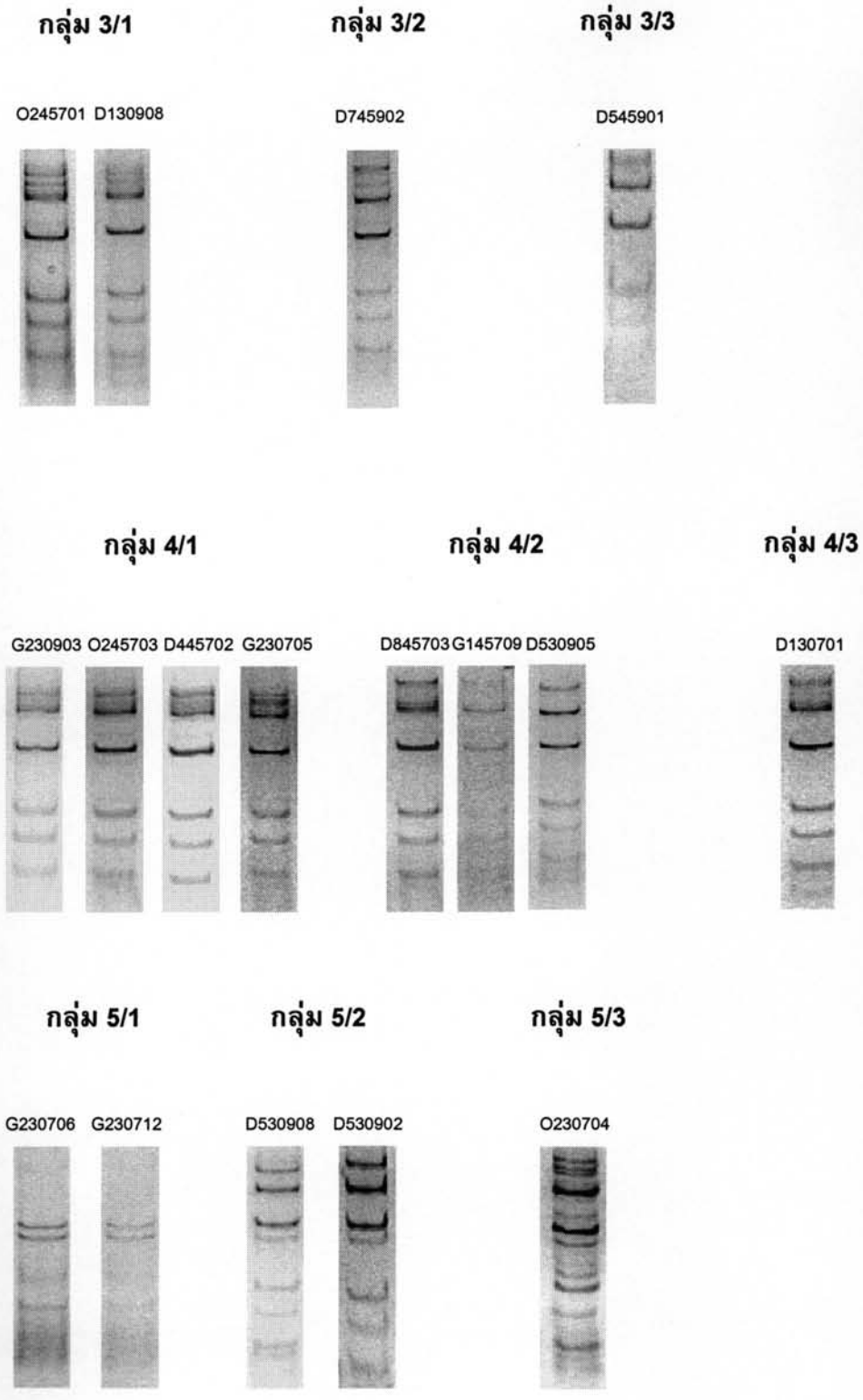
รูปที่ จ.2 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI



รูปที่ จ.2 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI



รูปที่ จ.2 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI



รูปที่ จ.2 กลุ่มที่จัดตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16S-ITS RFLP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*UI

กลุ่มที่ 6/1

O230706

กลุ่มที่ 6/1

O245906

กลุ่มที่ 6/1

D730901

กลุ่มที่ 7/1

O130903

กลุ่มที่ 7/1

D530703

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฉวีวรรณ ปันคำ เกิดเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2545 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

การเสนอผลงานวิจัย

Punkum, C., Penpetch, P., Pinpanichakarn, P. and Palaga, T. Poster presentation in the Biological Science and Technology Category at the 8th National Grad Research Conference, 7-8 September 2007, Mahidol University, Salaya, Bangkok Thailand.

ทุนวิจัย

งบประมาณแผ่นดินภายใต้โครงการวิจัยการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน ปีงบประมาณ 2548-2550