ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) (Shimizu *et al*., 2000)

glucose	5.0	กรัม
soluble starch	5.0	กรัม
beef extract	1.0	กรัม
yeast extract	1.00	กรัม
NZ-case (enzyme hydrolyzed casein)	2.00	กรัม
NaCl	2.00	กรัม
$CaCO_3$	1.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

จากนั้นผสมสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่

- Trimethoprim 20 มิลลิกรัม ละลายใน Dimethyl sulfoxide-DMSO 2 มิลลิลิตร ต่ออาหารIMA-2 ปริมาตร 1 ลิตร
- Naldixic acid 10 มิลลิกรัม ใน 0.1 N NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- Heritage 10 มิลลิลิตร ต่ออาหารIMA-2 ปริมาตร 1 ลิตร (สารละลาย Heritage ได้จาก Heritage (Axoxystrobin) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 29 มิลลิลิตร)

นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Trace salts solution

$FeSO_4.7H_2O$	0.10	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.10	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ISP medium 2 : Yeast extract-malt extract agar (Pridham *et al*., 1956-57)

Bacto-Yeast Extract (Difco)	4.00	กรัม
Bacto-Malt Extract (Difco)	10.00	กรัม
Bacto-Dextrose (Difco)	4.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 7.3 จากนั้นเติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. ISP medium 3 : Yeast extract-malt extract agar

(Küster, 1995a cited by Shirling and Gottlieb, 1972)

Oatmeal	20.00	กรัม
Agar	10.00	กรัม

ละลาย Oatmeal ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และเติม Trace salts solution 1.0 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอช (pH) ให้มีค่า 7.2 โดยใช้ NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

5. ISP medium 4 : Inorganic salts-starch agar

(Küster, 1995b cited by Shirling and Gottlieb, 1972)

Solution A: Difco solublestarch 10.0 กรัม ผสมกับน้ำเย็น 500.0 มิลลิลิตร

Solution B:

K_2HPO_4	1.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.00	กรัม
NaCl	1.00	กรัม
$(NH_4)SO_4$	2.00	กรัม
$CaCO_3$	2.00	กรัม
น้ำกลั่น	500.00	มิลลิลิตร
Trace salts solution	1.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่า 7.0-7.4 ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน จากนั้นเติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. ISP medium 5 : Glycerol-asparagine agar (Pridham and Lyons, 1961)

L-Asparagine (anhydrous basis)	1.00	กรัม
Glycerol	10.00	กรัม
K_2HPO_4(anhydrous basis)	1.00	กรัม
Trace salts solution	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่า 7.0-7.4 จากนั้นเติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7. ISP medium 6 : Peptone-yeast extract iron agar (Tresner and Danga, 1958)

Bacto-Peptone Iron Agar,dehydrate (Difco)	36.00	กรัม
Bacto-Yeast Extract (Difco)	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่า 7.0-7.2 จากนั้นเติมผงวุ้นลงไป 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. ISP medium 7 : Tyrosine agar (Shinobu, 1958)

L-Asparagine (Difco)	1.00	กรัม
L-Tyrosine (Difco)	1.00	กรัม
Glycerol	15.00	กรัม
K_2HPO_4(anhydrous basis)	0.50	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	กรัม
NaCl	0.50	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	2.00	กรัม
Trace salts solution	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่า 7.2-7.4 จากนั้นเติมผงวุ้น 20.0 กรัมก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

9. ISP medium 9 : Carbon utilization medium (Modified from Pridham and Gottlieb, 1948)

ชนิดของน้ำตาลที่ทำการศึกษาได้แก่ *D*-glucose, *L*-arabinose, sucrose, *D*-xylose, inositol, *D*-mannose, *D*-fructose, *L*-rhamnose และ raffinose โดยใช้น้ำตาลแต่ละชนิด ปริมาตร 0.6 กรัมเติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อน้ำตาลโดยการใช้สารละลาย Diethyl Ether $(C_2H_5)_2O$ (Nacalai Tesque, Japan) ผสมกับน้ำตาลแต่ละชนิด โดยต้องทำภายใต้ตู้ดูดควัน เนื่องจากสารละลายชนิดนี้เป็นอันตราย ทิ้งไว้ให้ระเหยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

A. Pridham and Gottlieb trace salts

$Cu_2SO_4.5H_2O$ (anhydrous basis)	0.64	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.11	กรัม
$MnCl_2.4\ H_2O$	0.79	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	100.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ใช้สารละลาย Pridham and Gottlieb trace salts ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 3-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

B. Basal mineral salts agar

$(NH_4)_2SO_4$	2.64	กรัม
K_2HPO_4.anhydrous	2.38	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	5.65	กรัม
$MgSO_4.H_2O$	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่า 6.8-7.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จากนั้นเติมผงวุ้น 15.0 กรัม ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. Potato dextrose agar

Glucose	20.00	กรัม
Potato	300.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีส

ตารางแสดงคุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับจีนัส (Holt *et al.*, 1994)

Diagnoatic amino acid	Diagnostic sugar	Typical key morphological features and additional chemical properties	Possible generic assignment (group number)
No DAP[a]	NA[a]	Only substrate mycelium formed; breaks into motile elements	*Oerskovia* (22)
		Only substrate mycelium formed; breaks into motile coccoid elements in older cultures	*Jonesia* (22)
		Sterile aerial mycelium formed; substrate mycelium breaking up into nonmotile elements	*Promicromonospora* (22)
	Xylose	Sporangia with motile spores	*Actinoplanes* (24)
	Madurose	Short chains of conidia on the aerial mycelium	*Actinomadura* (26)
L-DAP	NA	Both aerial and substrate mycelia breaking up into fragments	*Nocardioides* (22)
		Only substrate mycelium formed; breaks into rods and cocci	*Terrabacter* (22)
		Only substrate mycelium formed g terminal or subterminal vesicles	*Intrasporangium* (25)
		Aerial mycelium with long chains of spores	*Streptomyces* (25) *Kitasatosporia* (29)
		Sclerotia formed (*Chainia* type)	*Streptomyces* (25)
		Very short chains of large conidia formed (*Microellobosporia* type) on aerial and vegetative mycelium	*Streptomyces* (25)
		Whorls off straight chains of conidia formed	*Streptoverticillium* (25)
		No aerial mycelium; club-shaped sporangia formed terminally on the vegetative mycelium	*Kineosporia* (25)
		Aerial mycelium only, motile elements formed	*Sporichthya* (25)
Meso-DAP[b]	Xylose and arabinose	No sporangia; single conidia formed on substrate mycelia, often in large black mucoid masses	*Micromonospora* (24)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

		No sporangia; short chains of conidia formed protruding from the surface of the colonies	*Catellatospora* (24)
		Chains of conidia on aerial mycelium	*Glycomyces* (29)
		Dactyloid oligosporic sporangia protruding from the surface of the colonies; spores motile	*Dactylosporangium* (24)
		Sporangia containing spherical motile spores formed on the surface of colonies	*Actinoplanes* (24)
		Same; rod-shaped sporangiospores motile by polar flagella	*Ampullariella* (24)
Diagnoatic amino acid	Diagnostic sugar	Typical key morphological features and additional chemical properties	Possible generic assignment (group number)
		Same; sporangiospores with lateral flagella	*Pilimelia* (24)
		Multilocular sporangia formed; spores nonmotile	*Frankia* (23)
Meso-DAP	Mandurose	Short chains of conidia on aerial mycelium, often curled into a crozier	*Actinomadura* (26)
		Chains of conidia with only two spores	*Microbispora* (26)
		Chains of conidia mainly with four (2-6) spores	*Microtetraspora* (26)
		Sporangia formed with two motile spores	*Planobispora* (26)
		Sporangia formed with only one motile spore	*Planomonospora* (26)
		Spherical sporangia formed on aerial mycelium containing many motile rod-shaped spores	*Spirillospora* (26)
		Spherical sporangia formed on aerial mycelium containing many aplanospores	*Streptosporangium* (26)
		Multiocular sporangia formed	*Dermatophilus* (23) *Frankia* (23)
Meso-DAP	Fucose	Multiocular sporangia formed	*Frankia* (23)
		Sporangia with motile spores	*Actinoplane* (24)
	Rhamnose and galactose	Both aerial and substrate hyphae fragment into nonmotile elements	*Saccharothrix* (29)
	Rhamnose, galactose, and mannose	Streptomyces type of morphology	*Streptoalloteichus* (27)
	Galactose	Streptomyces type of morphology	*Kitasatosporia* (29)
	Arabinose and galactose	NMA[a] present; morphology ranging from fugacious substrate mycelium only to *Streptomyces*-like	*Nocardia* (22)
		NMA present; soft, salmon to pink organisms	*Rhodococcus* (22)
		NMA present; only substrate mycelium formed,	*Gordona* (22)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

		which breaks into rods and cocci	
		NMA present; only substrate mycelium formed, which breaks into single, paired or masses rods	*Tsukamurella* (22)
		NMA present; paired spores formed on substrate mycelium; aerial mycelium sparse	*Actinobispora* (22)
		NMA present; long cylindrical spores on the aerial mycelium; spores formed by budding	*Pseudonocardia* (22)
		NMA absent; single spores formed mainly on the aerial hyphae	***Saccharomonospora*** (22)
		NMA absent; very long chains of conidia on the aerial mycelium	***Saccharopolyspora*** (22)
Diagnoatic amino acid	Diagnostic sugar	Typical key morphological features and additional chemical properties	Possible generic assignment (group number)
		NMA absent; long chains of conidia on the aerial mycelium; halophile	*Actinopolyspora* (22)
		NMA absent; substrate mycelium tends to break into nonmotile elements; aerial hyphae may be formed and may also segment	*Amycolata* (22) *Amycolatopsis* (22)
		NMA absent; aerial mycelium bearing curled hyphae embedded in an amorphous matrix	*Kibdelosporangium* (29)
		NMA absent; long chain of spores formed on aerial and substrate mycelium; spores become moyile in an aqueous environment	*Actinokineosporia* (22)
		NMA absent; aerial mycelium tends to fragment into rods and cocci; short chains of spores also formed	*Pseudoamycolata* (22)
	No diagnostic sugar	Single conidia formed; these are heat-resistant bacterial endospores	*Thermoactinomyces* (28)
		Same as above but the spores are not heat-resistant	*Thermomonospora* (27)
		Long chains of spores formed by the aerial hyphae	*Nocardiopsis* (27)
		Aerial hyphae, often united into synnemeta releasing motile spores	*Actinosynnema* (27)
		Multilocular sporangia releaseing motile spores	*Geodermatophilus* (27)

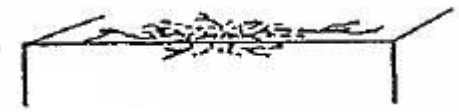
[a] Abbreviation: DAP,diaminopimelic acid ; NA, not applicable ; NMA, nocardomycolic acid.

[b] May also contain hydroxyl forms of DAP that may even replace *meso*-DAP.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะของแอคติโนมัยซีสในจีนัสต่างๆ (Holt *et al*., 1994)

Group 20

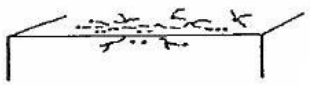


Actinomyces

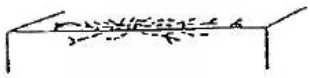
Rothia

Agromyces

Group 22



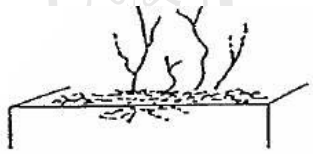
Jonesia



Gordona

Rhodococcus

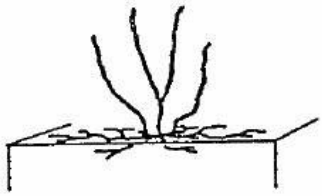
Tsukamurella



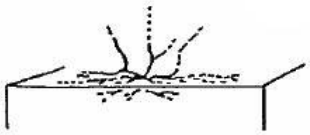
Nocardia

Actinobispora

Actinokineospora



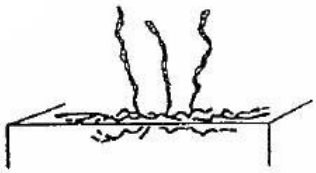
Actinopolyspora



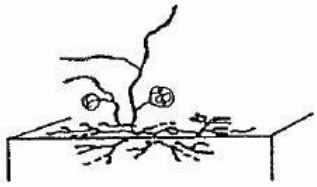
Amycolata

Amycolatopsis

Pseudomycolata



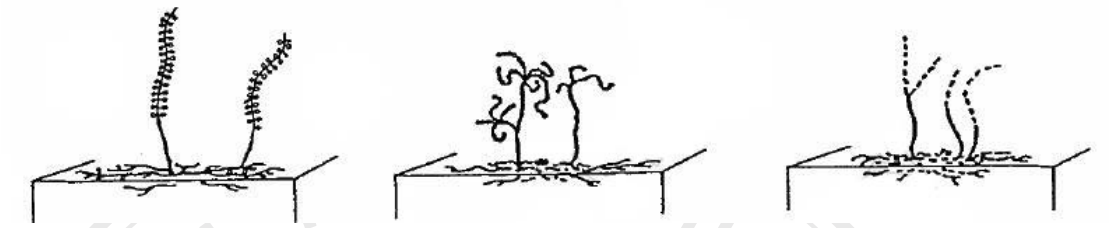
Pseudonocardia



Kibdelosporangium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Cop
A I

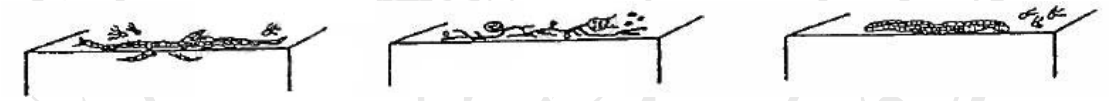
Group 22 (continued)



Saccharomonospora *Saccharopolyspora* *Nocardioides*

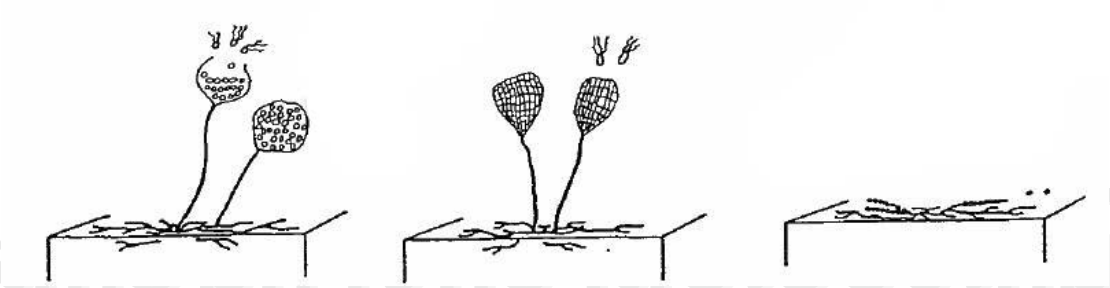
Terrabacter *Promicromonospora* *Oerskovia*

Group 23



Dermatophilus *Frankia* *Geodermatophilus*

Group 24

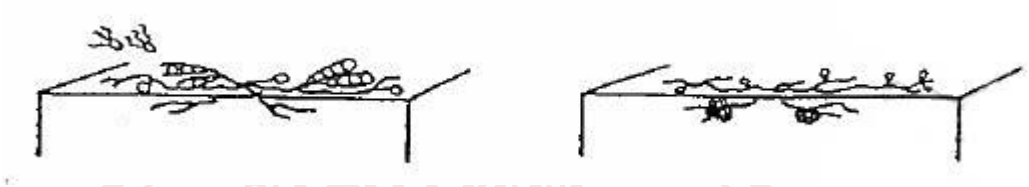


Actinoplanes *Ampullariella* *Catellospora*

Pilimelia

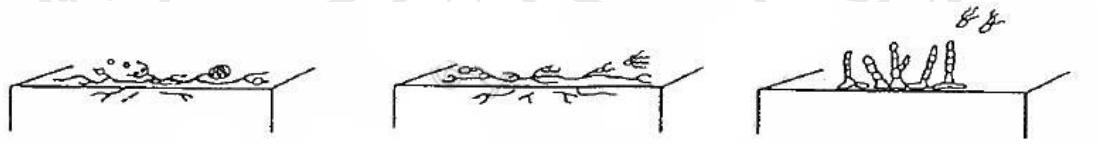
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 24 (continued)

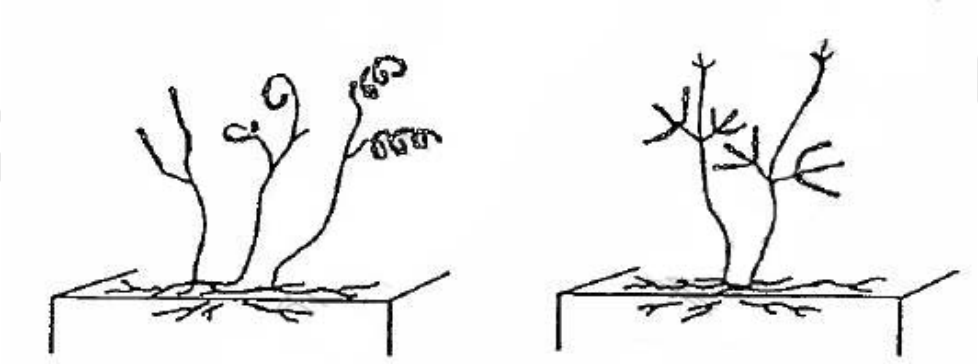


Dactylosporangium *Micromonospora*

Group 25



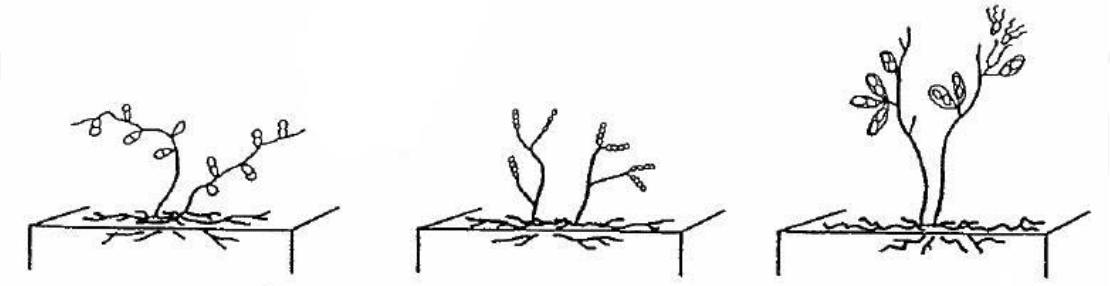
Intrasporangium *Kineosporia* *Sporichthya*



Streptomyces *Streptoverticillium*

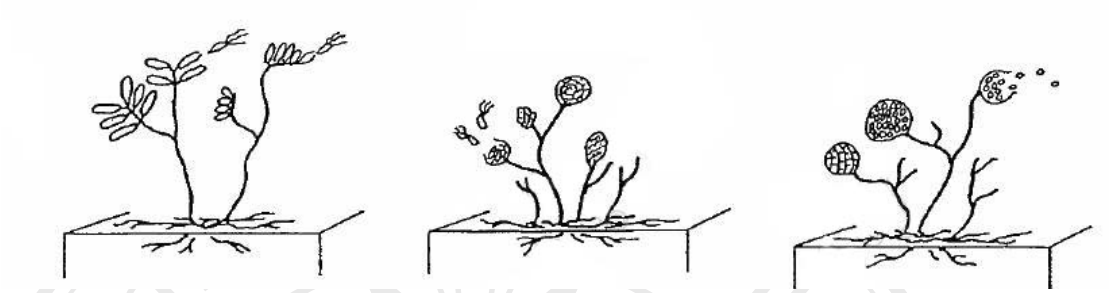
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Cop
A l

Group 26

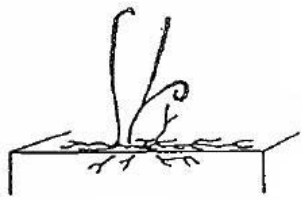


Microbispora *Microtetraspora* *Planobispora*

Group 26 (continued)

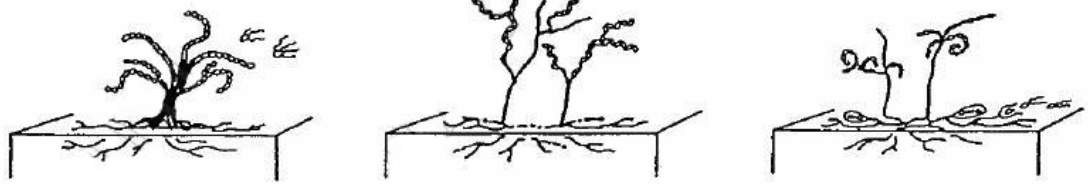


Planomonospora *Spirillospora* *Streptosporangium*

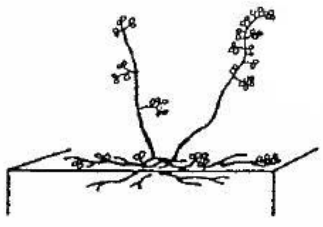


Actinomadura

Group 27



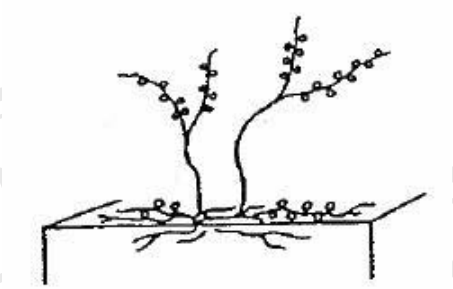
Actinosynnema *Nocardiopsis* *Streptoalloteichus*



Thermomonospora

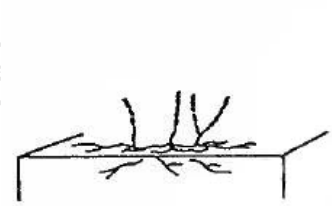
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 28

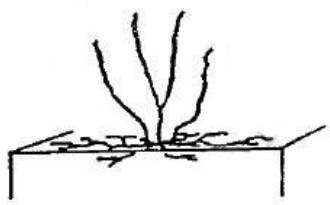


Thermoactinomyces

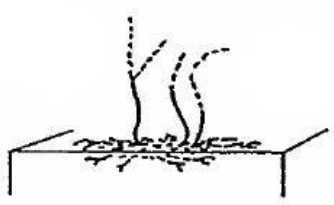
Group 29



Glycomyces



Kitasatosporia



Saccharothrix

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปิยะธิดา พุกคล้าย
วัน เดือน ปีเกิด	11 มิถุนายน 2525
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาจากชั้นประถมศึกษา จากโรงเรียนพระหฤทัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนพระหฤทัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเรยีนา เซลี อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาสตรบัณฑิต) ปีการศึกษา 2546 จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	11 หมู่ 8 ต.สันกำแพง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ 50130

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved