สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดิน

T047308

นางสาวมลล์วฐู เอื้อพรหมมาต
นางสาวศศิธร อำนาจรุ่งตระกูล
นางสาวอารีวัลย์ วนาอุปถัมภ์กุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....47308
วัน, เดือน, ปี.....27 มิ.ย. 2546

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening of Antibiotic-producing Actinomycetes from Soil

Monwatu Uraphrommart

Sasitorn Amnatrungtrakool

Areewan Wanaupathumkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Biotechnology

Faculty of Science

King Mongkut' s Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดิน

นักศึกษา นางสาวมลล์วธู เอื้อพรหมมาต

นางสาวศศิธร อำนาจรุ่งตระกูล

นางสาวอารีวัลย์ วนาอุปถัมภ์กุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ดร. กนกพร สมพรไพลิน	
กรรมการ อาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง **การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดิน**

นักศึกษา **นางสาวมลล์วฐู เอื้อพรหมมาต**
นางสาวศศิธร อำนาจรุ่งตระกูล
นางสาวอารีวัลย์ วนาอุปถัมภ์กุล

ภาควิชา **ชีววิทยาประยุกต์** **คณะวิทยาศาสตร์**
สาขาวิชา **เทคโนโลยีชีวภาพ**
ปีการศึกษา **2545**
อาจารย์ที่ปรึกษา **อาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์**

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีต ในตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย ด้วยอาหาร starch casein agar ที่ดัดแปลงจาก Kuster และ Willium (1964) สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 96 ไอโซเลท และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตจำนวน 77 ไอโซเลท สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช คือ *Aspergillus niger* หรือ *Peranophythora lichi* ได้ โดยมีเชื้อแอคติโนมัยซีตเพียง 10 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิด จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งสูงที่สุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูง จำนวน 3 ไอโซเลท คือ sam 7 sam 10 และ sam 92 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว พบว่า sam 10 ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้สูงสุด ส่วน sam 92 ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi* ได้สูงที่สุด รวมทั้งมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Screening of Antibiotic-producing Actinomycetes from Soil

Name Miss Monwatu Uraphrommart
Miss Sasitorn Amnatrungtrakool
Miss Areewan Wanaupathumkul

Department Applied Biology

Program B.sc. (Biotechnology)

Academic Year 2545

Special Project Advisor Mr.Prasit Deewatthanawong

ABSTRACT

Soil samples from various source regions in Thailand were isolated for *Actinomycete* on Starch Casein Agar and then screened for antibiotic production. The results indicated that 77 isolates from 96 isolates could produce antibiotic that inhibit *Aspergillus niger* and *Peranophythora lichi* . The test showed 10 isolates of *Actinomycete* could inhibit both plant disease-causing fungi. A significant inhibition of *Aspergillus niger* and *Peranophythora lichi* were obtained in isolate sam 7, sam 10 and sam 92 which gave high cellulase activity. Comparison of antibiotic production of 3 isolates were determined in shake-flask cultivation. The isolate sam 10 gave excellent control of *Aspergillus niger* and sam 92 showed the best control of *Peranophythora lichi* and gave the highest cellulase activity.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้บรรลุผลสำเร็จได้ โดยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจาก อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล และ ดร. กนกพร สมพรไพลิน ประธานและกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ซึ่งท่านได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคุณพรพิมล อธิปัญญาคม นักวิชาการเกษตร 8 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรได้อนุเคราะห์เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตึกวิทย์เก่าและตึกจุฬาภรณ์ 1 ที่ให้ความสะดวกต่อการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในขณะปฏิบัติการการทำโครงงานครั้งนี้ด้วย ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

นางสาว มลล์วฐู เอื้อพรหมมาต
นางสาว ศศิธร อำนาจรุ่งตระกูล
นางสาว อารีวัลย์ วนาอุปถัมภ์กุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	5
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	6
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	32
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ	14
2	เชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ	32
3	ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีต	38
4	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต 10 ไอโซเลท	43

ตารางภาคผนวกที่

1	ตัวอย่างไฟล์ข้อมูล	91
2	ผลลัพธ์ทางสถิติจากการป้อนข้อมูลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*	92
3	ผลลัพธ์ทางสถิติจากการป้อนข้อมูลการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi*	92
4	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*	93
5	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi*	96
6	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobremae*	98
7	ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส จากเชื้อแอคติโนมัยซีต	101
7	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	102
9	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
10 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 บนอาหาร starch casein agar	36
2	โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 บนอาหาร starch casein agar	36
3	โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 บนอาหาร starch casein agar	36
4	ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 บน starch casein agar	42
5	ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 บน starch casein agar	42
6	ผลการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobremae* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 บน starch casein agar	42
7	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7	44
8	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10	44
9	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92	44
10	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	46
11	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	47
12	ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซิเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0	48
13	เปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam10 และ sam92 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว starch casein	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam10 และ sam92 บนอาหารแข็ง PDA โดยวิธีการใช้เปเปอร์ดิสก์ (paper disc)	51
15	ผลการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam10 และ sam92 บนอาหารแข็ง PDA โดยวิธีการใช้เปเปอร์ดิสก์ (paper disc)	52
16	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	53
17	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	54
18	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	55
19	ลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7	57
20	ลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10	58
21	ลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92	59

รูปภาคผนวกที่

1	ขั้นตอนของ spread plate technique	80
2	ลักษณะการลากเชื้อโดยวิธี streak plate	82
3	การย้อมสีแบบแกรม	84
4	กราฟกลูโคสมาตรฐาน	88
5	กราฟแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน	90
6	อัตราจำเพาะของการเติบโต (μ) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam10 และ sam92	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปภาคผนวกที่		หน้า
7	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	107
8	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	108
9	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*	109
10	ผลได้ของเซลล์ (Yx/s) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam10 และ sam92	110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ผลผลิตส่วนใหญ่นอกจากจะใช้อุปโภค บริโภคภายในประเทศ ยังส่งเป็นสินค้าออกไปขายยังต่างประเทศด้วย ในการปลูกพืชของเกษตรกรไทยมักได้รับผลผลิตค่อนข้างต่ำ เพราะขาดความรู้ความชำนาญ และความเข้าใจในวิทยาการแผนใหม่ เช่น การสรรหาวิธีการต่าง ๆ ที่เหมาะสมมาใช้เพื่อให้พืชปราศจากศัตรูที่เข้าทำลาย ศัตรูพืชทั้งหลายนั้นมีโรคพืชเป็นสำคัญ ซึ่งมักเกิดจากเชื้อรา จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจมาก ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรมักจะใช้สารเคมี ในการกำจัดศัตรูพืช และโรคพืชต่าง ๆ ทำให้เกิดปัญหาการสะสมของสารเคมีในพื้นที่ เพาะปลูก รวมทั้งการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ทำให้เกิดอันตรายกับ คน พืช และสัตว์ อีกทั้งยังเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการที่จะต้องสั่งซื้อสารเคมี ซึ่งสารเคมีบางชนิดนั้นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ก่อให้เกิดการขาดดุลทางการค้า ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการทดลองนำสารปฏิชีวนะหลายชนิดมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช สารปฏิชีวนะที่มีการทดลองนำไปใช้กับพืช ได้แก่ cycloheximine , griseofulvin , blasticidins , polyoxins ส่วนใหญ่มีผลต่อเชื้อราและยีสต์ ซึ่งจะผลิตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีต (Actinomycetes) โดยเฉพาะจีนัส Streptomyces แอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน

สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและ/หรือการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้โดยใช้เพียงความเข้มข้นต่ำ ๆ เท่านั้น (Waksman, 1961)

สารปฏิชีวนะเป็นสารเมตาโบไลท์ (metabolites) ที่ไม่ได้ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แต่ผลิตขึ้นมาเป็นพิเศษในจุลินทรีย์ผู้ผลิต เรียกว่า สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งผลิตขึ้นในช่วงหลังการเจริญเติบโตโดยขบวนการ (pathway) ต่าง ๆ ไม่ได้ผลิตในช่วงของการเจริญเติบโต ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต ทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีตเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะตามธรรมชาติ ปัจจุบันมีแอคติโนมัยซีตมากกว่า 80 จีนัสที่ค้นพบว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งการผลิตต้องผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) เช่น การผลิต streptomycin ต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ถึง 30 ขั้นตอน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ที่ถูกค้นพบสร้างขึ้นจากจุลินทรีย์พวกแอคติโนมัยซีต

จีนัส Streptomyces เช่น streptomycin มาจากเชื้อ *Streptomyces griseus* , chloramphenicol มาจากเชื้อ *S. venzvela* , aureomycin และ tetracycin มาจากเชื้อ *S. aureofaclens* (Coyne,1999) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่น ได้แก่ วิตามิน เอนไซม์ รงควัตถุ เป็นต้น แต่เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายเนื่องจากการกลายพันธุ์ และสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติ นิยมคัดเลือกจากดิน โดยทดลองให้แอคติโนมัยซีตอยู่ในสภาวะการดำรงชีวิตแบบแข่งขันในดิน การผลิตสารปฏิชีวนะจะทำให้แอคติโนมัยซีตเข้าสู่การเจริญเติบโตในระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase) หรือเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (sporulation) (Coyne,1999) เมื่อได้สารปฏิชีวนะแล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติของสาร เช่น disc diffusion test โดยการนำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อก่อโรคถ่ายลงไปในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งอยู่ และก่อนที่จะนำไปบ่มให้นำแผ่นกระดาษทดสอบ (paper disc) ไปดูดซับสารปฏิชีวนะต่างชนิดกันแล้วนำไปวางไว้ยังจุดต่าง ๆ กันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สารปฏิชีวนะจะแพร่กระจายในแต่ละแผ่นกระดาษ ถ้าจุลินทรีย์ไวต่อสารปฏิชีวนะจะเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบๆ แผ่นกระดาษ วิธีการนี้ไม่เหมาะกับแบคทีเรียที่เติบโตช้า ตัวอย่างเช่น *Mycobacterium tuberculosis* เพราะจะทำให้สารปฏิชีวนะแพร่ออกไปก่อนที่แบคทีเรียจะเจริญ ต้องเป็นแบคทีเรียที่สามารถเติบโตได้ภายในข้ามคืนจึงจะเหมาะสม (Singleton, 1998)

สารปฏิชีวนะไม่สามารถผลิตได้คงที่ จะเริ่มช้าเมื่อการเจริญช้าลงหรือหยุดชะงัก และยังมีสาเหตุอื่น ๆ ที่ทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดลง ตัวอย่างเช่น

1. แหล่งธาตุอาหารคาร์บอน (carbon source) เช่น กลูโคส ทำให้เกิดคาร์บอนเมตาโบไลท์เรคกูเลชั่น (carbon metabolite regulation) ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด
2. แหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (nitrogen source) การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนมีผลอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะ
3. อนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และขบวนการหายใจ เป็นผลให้การเจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง
4. โลหะ (trace metal) เช่น Mn, Fe, Zn มักจะมีบทบาทในการผลิตสารปฐมภูมิ ซึ่งความต้องการโลหะนั้นอยู่ในปริมาณน้อยมาก

ยังมีสภาวะอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ความเป็นกรดเป็นด่างในอาหาร ระดับอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของแอคติโนมัยซีต เป็นพวกโพรคาริโอต ที่มีลักษณะคล้ายรา ทำให้แยกออกได้ยาก แอคติโนมัยซีตกลุ่มแรก ๆ จะถูกเรียกว่า ray fungi โดยวิธีการแบ่งแยกออกเป็นหมวดหมู่ซึ่งจะอาศัยลักษณะที่ปรากฏ (morphology) ในเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) แอคติโนมัยซีตจะเจริญโดยสร้าง filamentous mycelia และสปอร์ แต่ยังมีโครงสร้างอื่นๆที่สามารถแยกแอคติโนมัยซีตออกจากราได้ โดยอาศัยคุณสมบัติที่สำคัญ 2 ประการ คือ

1. แอคติโนมัยซีตไม่มีนิวเคลียส จึงเป็นโพรคาริโอต
2. แอคติโนมัยซีตจะสร้างเส้นใย (hyphae) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าเส้นใยรามาก (รามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 ไมโครเมตร) (Coyne,1999)

แอคติโนมัยซีตที่จริงแล้วเป็นแบคทีเรียซึ่งเจริญเป็นกลุ่มเส้นใย มีเส้นใยยาวเรียวแตกกิ่งก้านอยู่ภายในดินทั้งหมดยกเว้นจีนัส Actinomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แอคติโนมัยซีตโดยมากจะพบในดิน และเกี่ยวข้องกับ coryneform bacteria และ mycobacteria เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Schlegel, 1997) ส่วนมากจะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ผลิตสปอร์เดี่ยว คู่ หรือสายโซ่ ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ซึ่งอยู่บนเส้นใย มีเพียงส่วนน้อยที่อยู่ในสภาพของสปอร์ในโครงร่างพิเศษ ที่เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium)

แอคติโนมัยซีตจะมีสภาพร่วมกับแบคทีเรีย แต่มีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับราด้วย ดังนี้ กลุ่มเส้นใยของแอคติโนมัยซีตมีการแตกกิ่งที่ยาว ลักษณะของแอคติโนมัยซีตจำนวนมากเป็นกลุ่มเส้นใยที่ยื่นไปในอากาศ (aerial mycelium) เช่นเดียวกับโคนิเดีย และการเจริญของแอคติโนมัยซีตในอาหารเหลว (liquidculture) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีตบางจีนัสไม่สามารถสร้างกลุ่มเส้นใยที่ยื่นไปในอากาศได้ คล้ายกับ mycobacterium และ corynebacteria

โคโลนีของแอคติโนมัยซีตที่เจริญบนอาหารแข็งจะมีความสัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาในการบ่ม โคโลนีในบางจีนัสมีการเจริญบนผิวหน้าวุ้นอาจมีลักษณะเหนียวข้น และเกาะติดกันแน่นกับอาหารแข็ง บางจีนัสเจริญบนผิวหน้าอาหารมีลักษณะเป็นผง และมักสร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อมีการสร้างสปอร์ยื่นไปในอากาศ (Alexander, 1999)

แอคติโนมัยซีตไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (saprophytes) เจริญบนอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อยผุพัง บางชนิดเป็นพาหะนำโรคแก่มนุษย์ เช่น *Mycobacterium leprae* สาเหตุของโรคเรื้อน และ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรค แอคติโนมัยซีตอื่น ๆ เป็นพาหะนำโรคของสัตว์และพืช แต่แอคติโนมัยซีตที่พบในดินไม่เป็นอันตราย บางชนิดมีประโยชน์ เช่น แอคติโนมัยซีตในจีนัส Frankia จะอยู่ร่วมกับพุ่มไม้และต้นไม้ใหญ่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยซีตมีอยู่เป็นจำนวนมากและมีทั่วไปไม่เฉพาะแต่ในดิน แต่หลายชนิดจะอาศัยอยู่เป็นส่วนประกอบของปุ๋ยหมัก ตะกอนในแหล่งน้ำ และก้นทะเลสาบ มีปริมาณมากเป็นอันดับสองของแบคทีเรียในดิน ซึ่งมีจำนวน 10^5-10^8 propagules / g soil (propagule เป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ที่สามารถโต และสืบพันธุ์ได้) แอคติโนมัยซีตจะพบมากในทุ่งหญ้า ดินในแปลงเพาะปลูก และดินที่ทำการเกษตร ตามลำดับ ซึ่งจำนวนขึ้นกับสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบนิเวศ ถ้าขุดดินให้ลึกลงจำนวนของแอคติโนมัยซีตจะน้อยลง แต่จะมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นมากขึ้น

แอคติโนมัยซีตเป็นพวกต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญ ฉะนั้นจะโตได้ไม่ดีในดินที่เปียก และไม่ทนต่อความแห้งแล้ง ยกเว้นสปอร์ เพราะ 30-90 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนมัยซีตจะสามารถคืนสภาพได้หลังจากที่อยู่ในสภาวะที่แห้งแล้ง แอคติโนมัยซีตโตได้เล็กน้อยที่ 5 องศาเซลเซียส แยกได้จากดินที่มีความร้อนมากกว่าดินที่มีความเย็น เนื่องจากสปอร์ที่คืนสภาพได้พบในดินที่มีความร้อนมากกว่าดินที่มีความเย็น แต่ไม่ได้หมายความว่ามันจะชอบอุณหภูมิสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37องศาเซลเซียส แต่บางชนิดโตได้ที่ 55-65 องศาเซลเซียส ในกองปุ๋ยหมัก ซึ่งมีจำนวนถึง 10^5 propagules/g compost

แอคติโนมัยซีตทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดี พบว่าในดินที่เป็นด่าง จุลินทรีย์ที่แยกได้มักเป็นแอคติโนมัยซีต 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทางกลับกัน แอคติโนมัยซีตไม่ทนต่อสภาวะเป็นกรด สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ที่พีเอชน้อยกว่า 5 แอคติโนมัยซีตอาจเหลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ คุณสมบัติที่ไม่ทนกรดถูกนำมาใช้ควบคุมแอคติโนมัยซีตที่เป็นพาหะโรคพืช เช่น สามารถควบคุมโรค potato scrab ที่เกิดจาก *Streptomyces scabies* โดยปรับดินให้มีความเป็นกรดได้ แอคติโนมัยซีตเป็นพวก saprophytes เมื่ออินทรียสารเพิ่มขึ้นจำนวนของแอคติโนมัยซีตก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

แอคติโนมัยซีตมีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสลายสับสเตรท แต่ใช้เซลลูโลส และไคตินได้ (Coyne,1999) เนื่องจากแอคติโนมัยซีตเจริญช้า จึงมีการเลือกใช้อาหารเฉพาะสำหรับการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีการใส่ไคตินลงไปเพราะพอลิแซคาไรด์นี้ถูกนำไปใช้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และเมื่อเทียบกับแบคทีเรียและราแล้วจะใช้ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่า (Alexander, 1999)

จำนวนและชนิดของแอคติโนมัยซีตขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ภายในดิน เช่น อุณหภูมิของดิน ชนิดของดิน ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ปริมาณอินทรียสาร พืชที่อาศัยในดิน ความลึกของหน้าดิน และปริมาณความชื้น แอคติโนมัยซีตจะพบน้อยในดินที่ชุ่มน้ำมีออกซิเจนต่ำ ดินจากป่าที่มีพีเอชต่ำ จะมี Streptomyces ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด ในขณะที่พื้นที่แห้งแล้ง มีพีเอชเป็นเบส มี Streptomyces เล็กน้อย และไม่ค่อยพบ genera Actinoplanes และ Streptosporangium ตัวอย่างดินที่ดีควรเก็บจากผิวหน้าดินลึกลงไป 4 เซนติเมตร ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง ถ้าเก็บไว้นานเกินไปจะทำให้ปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีตลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดินควรเก็บไว้ในถุงพอลิเอธิลลีน (polyethylene) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้นถึงจะดีที่สุด (Labeota, 1990)

แอคติโนมัยซีตมีช่วงการเจริญที่ยาวนานกว่าราและแบคทีเรีย เมื่อสารอาหารมีสูงระดับการแข่งขันในอาหารมีปริมาณมากเชื้อแอคติโนมัยซีตจะมีปริมาณน้อยลง และเมื่อสารอาหารมีอยู่อย่างจำกัด และระดับการแข่งขันน้อยลงเชื้อแอคติโนมัยซีตจะกลายมาเป็นตัวที่มีความสำคัญ

การใช้แหล่งคาร์บอนจะประกอบด้วยโมเลกุลของคาร์บอนที่มีความซับซ้อนน้อย ไปจนถึงโมเลกุลที่มีความซับซ้อนสูงจากกรดอินทรีย์ น้ำตาลจนถึงพอลิแซคคาไรด์ ไขมัน และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทอะลิฟาติก (aliphatic) เซลลูโลสจะถูกย่อยโดย Streptomycete ขบวนการเมตาบอลิซึมของ paraffin , phenol , steroids และ pyrimidines จะเป็นข้อพิสูจน์ที่ดีสำหรับสปีชีส์ Nocardia ส่วน Micromonospora เป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายไคติน เซลลูโลส กลูโคซิเดส (glucosides) และเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) ได้

แอคติโนมัยซีตได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เพราะหลายสายพันธุ์มีความสามารถที่จะสังเคราะห์สารพิษ (toxic metabolites) Streptomyceteที่แยกเป็นเชื้อเดี่ยวแล้วอาจผลิต antimicrobial หรือที่เรียกกันว่า สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีตสามารถยับยั้งการเจริญ หรือกำจัดแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ตามลำดับ (Alexander, 1999)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตจากแหล่งดินธรรมชาติที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาการเติบโตและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีตในสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากดินที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด

1.3 ขอบเขตของโครงงาน

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากแหล่งดินธรรมชาติ จากนั้นศึกษาการเติบโต และการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ในอาหารสูตร starch-casein แล้วนำสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ โดยเลือกเก็บเฉพาะผิวหน้าดินซึ่งมีความลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีต

2.1 เตรียมสารละลายของดิน โดยชั่งดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{2}–10^{5} เท่า ตามลำดับ

2.2 ปิเปตสารละลายของดินที่เตรียมไว้ ที่อัตราการเจือจาง 10^{3}–10^{5} เท่า ใส่จานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร starch casein agar จานละ 0.1 มิลลิลิตร อัตราการเจือจางละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำการกระจายเชื้อโดยวิธี spread plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

2.3 ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต และนำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี cross streak technique

3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้

บันทึกลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี การติดสีแกรมของเซลล์และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ

4. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิดโดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีต

4.1 เตรียมกล้าเชื้อ (seed inoculums) ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิด โดยเขี่ยเชื้อราวางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24–48 ชั่วโมง

4.2 เตรียมกล้าเชื้อ (seed inoculums) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อมา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร starch casein agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 3-5 วัน

4.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสม starch casein agar ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4 ใช้แท่งเจาะเชื้อ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงในจานเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4.1 แล้ววางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 4.3 หลังจากนั้นใช้แท่งเจาะเชื้อ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเจาะลงในจานเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4.2 แล้ววางเป็น 4 จุด โดยให้มีระยะห่างจากจุดกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง หรือบริเวณใส (inhibition zone หรือ clear zone) ที่

เกิดขึ้น

5. ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีต

เลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีบริเวณยับยั้งสูงสุดจากข้อ 4 จำนวน 10 เชื้อ มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข)

6. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีตและการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

นำเชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา จากการคัดเลือกเชื้อในข้อที่ 5 มาศึกษาถึงการเจริญเติบโตและการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว โดยถ่ายกล้าเชื้อแอคติโนมัยซีต 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว starch casein (กล้าเชื้อเตรียมจากเชื้อแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือกไว้ นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง) นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 6 และ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์หา

6.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข)

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอมไซม์เซลลูเลส โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ข)

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีวัดค่าสี ดัดแปลงจากวิธีของ Mahin และ Carr (1923) (ภาคผนวก ข)

6.4 การวัดกิจกรรม (activity) ของสารปฏิชีวนะ โดยวิธี Kirby-Bauer Test (paper disc) (ภาคผนวก ข)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดจากดินได้

2. เพื่อเป็นแนวทางในการใช้สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีตไปยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชบางชนิดได้

3. เป็นแนวทางในการผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีตในการใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะและธรรมชาติของเชื้อแอคติโนมัยซีต

แอคติโนมัยซีต (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในอันดับ Actinomycetales พบอยู่ทั่วไปในแหล่งดิน แหล่งน้ำ ปุ๋ยหมัก พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว เจริญได้ในดินที่เป็นกลางหรือเป็นด่างมากกว่าในดินที่เป็นกรด เชื้อชนิดนี้ในธรรมชาติมีบทบาทสำคัญคือ ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์สารหลายชนิดและมีความสำคัญทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม โดยสามารถนำมาผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ วิตามิน เอนไซม์ เป็นต้น เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต่อต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Goodfellow และคณะ, 1988)

Buchanan และ Gibbons (1974) แบ่งแอคติโนมัยซีตเป็น 8 ตระกูล (families) คือ Actinomycetaceae ; Actinoplanaceae ; Dermatophilaceae ; Frankiaceae ; Micromonosporaceae ; Mycobacteriaceae ; Nocardiaceae และ Streptomycetaceae แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ ในบางตระกูลสายเซลล์จะพัฒนาเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเล็กกว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของสายเซลล์ ประมาณ 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านได้ ซึ่งในบางตระกูลจะพบการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหาร (airial hypha) และ/หรือเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร (substrate hypha) ในลักษณะเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายที่มีจำนวนสปอร์ต่าง ๆ กัน สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวงหรือขดเป็นเกลียว และสายสปอร์อาจจะเกิดเดี่ยว ๆ จากเส้นใยหรือเกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย (verticillate) บางสกุลมีสปอร์เกิดอยู่ภายใน sporangium (Buchanan และ Gibbon, 1974)

แอคติโนมัยซีตจัดเป็นแบคทีเรีย เพราะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และไมโตคอนเดรีย (mitochondria) (Cross และ Goodfellow, 1973) ผนังเซลล์ประกอบด้วย mucopeptide (N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid) ; L-2,6-diaminopimelic acid ; glutamic acid ; glycine และ alanine (Davis, 1959; Waksman และ Henrici, 1974) ในแอคติโนมัยซีตแต่ละกลุ่มยังมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น รูปแบบของน้ำตาล ซึ่งใช้เป็นหลักในการจำแนกจีนัสของเชื้อแอคติโนมัยซีต (Yamaguchi, 1965 ; Buchanan และ Gibbons, 1974 ; Davis, 1959) โดยปกติแบคทีเรียใน Order นี้ย้อมติดสีแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยกเว้นพวก mycobacteria จะเป็น acid-fast และสมาชิกบางตัวในตระกูล Nocardiaceae เป็น weakly-acid-fast ส่วนใหญ่เป็น aerobe ยกเว้นบางสกุลในตระกูล Actinomycetaceae ที่อาจจะเป็น anaerobe ; facultative aerobe หรือ aerobe

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แอคติโนมัยซีตจำแนกจากประเภทของเปบติโดไกลแคน (peptidoglycan) และกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ ไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ เปบติโดไกลแคนในแอคติโนมัยซีตแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ กลุ่ม B กลุ่ม A เป็นการเชื่อมสายกรด N-acetylmuraminic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 3 กับ 4 และกลุ่ม B เชื่อมตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2 กับ 4 ส่วนกรดอะมิโนหลักที่ผนังเซลล์แบ่งเป็นหลายประเภท ส่วนใหญ่เป็นกรดไดอะมิโนพิมีลิค (diaminopimelic acid; DAP) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์คือ LL-DAP และ *meso*-DAP สำหรับองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมันแบ่งเป็นกรดไขมันฟอสโฟลิปิด (มี 5 ประเภทคือ PI-PV) (Goodfellow และ O' Donnell, 1993) และอนุพันธ์ของมีนาควิโนน (menaquinone) ประเภทต่าง ๆ สำหรับน้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนส กาแลคโตส มาดูโรส และไซโลส เป็นส่วนใหญ่

หากจำแนกแอคติโนมัยซีตตามสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะ กลุ่มที่สร้างได้มากที่สุด 3 กลุ่มใหญ่คือ Streptomycete , Actinoplanete และ Nocardioform (Okami และ Hotta, 1988)

Streptomyces จัดเป็นสมาชิกสกุลสำคัญ มีมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนมัยซีตทั้งหมด องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ประกอบด้วย เปบติโดไกลแคนชนิด A ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย N-acetylmuraminic acid เป็น LL-DAP มีฟอสโฟลิปิดประเภท II(PII type) คือ ประกอบด้วย phosphatidylinositol และ phosphatidylethanolamine อนุพันธ์ของมีนาควิโนน MK-9(H_8) และน้ำตาลภายในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนส กาแลคโตส และไซโลส (Williams และคณะ, 1989) ลักษณะของ *Streptomyces* เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงไปในเนื้อวุ้นและสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งสร้างสปอร์เป็นสายสปอร์รูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ สายสปอร์แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบลูป (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) ผิวโคโลนีที่เห็นจะมีลักษณะเรียบหรือขรุขระ มีหลายสีได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีมีเส้นใยอาหารเป็นสีน้ำตาลส่วนใหญ่ แต่อาจพบสีอื่น ๆ เช่นเดียวกับสีสปอร์ได้ *Streptomyces* สามารถสร้างรงควัตถุเมลานินและรงควัตถุอื่นที่ละลายออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนก *Streptomyces* ออกจากแอคติโนมัยซีตสกุลอื่นได้ (Sherling และ Gottlieb, 1966) นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (trans-1,10-dimethyl decalol) ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25–35 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส พีเอช 6.5 – 8.0 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงานได้หลายประเภทเช่น กลูโคส กลีเซอรอล และเปบโตน เป็นต้น มักจะทนเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ขึ้นไป บางชนิดอาจทนเค็มได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* จำเป็นต้องอาศัยแร่ธาตุบางชนิดได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น (Williams และคณะ, 1989)

Streptomyces สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายประเภท ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น ampicillin , penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (beta-lactam ring) ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่วนสารซึ่งมีสมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ nystatin , polyoxin และ anthracycline เป็นต้น nystatin มีโครงสร้างเป็น polyene มีสมบัติฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด (broad-spectrum fungicide) สำหรับ polyoxin มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา ส่วน anthracycline นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งด้วย โดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ topoisomeraseII ในเชื้อราทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้

นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังสามารถสร้างสารฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์กว้าง ได้แก่ สารในกลุ่ม macrolide เช่น avermectin สารฆ่าวัชพืช เช่น phosphinothricin สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) เช่น rapamycin และสารต่อต้านมะเร็ง เช่น limocrocin ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค สำหรับ *Streptomyces* ที่เป็นสาเหตุก่อโรค พบเพียงเล็กน้อย เช่น *S. scabies* ก่อโรค potato scab , *S. somaliensis* ก่อโรค actinomycetoma ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ *S. albus* ก่อโรคหอบหืดในคน เป็นต้น (Goodfellow และคณะ, 1988)

แอคติโนมัยซีตกลุ่ม actinoplanee สกุลที่สร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุดคือ *Micromonospora* ผนังเซลล์ของเชื้อสกุลนี้ประกอบด้วยเปบติโดไกลแคนประเภท A โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย N-acetylmuraminic acid เป็น *meso*-DAP มีฟอสโฟลิปิดแบบ PII และอนุพันธ์ของมีนาควิโนนเป็นแบบ MK-9(H_4) , MK-10(H_6) หรือ MK-12(H_6) โดยน้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนสกับไซโลส (Kawamoto,1989) *Micromonospora* ที่เจริญบนอาหารแข็งสร้างโคโลนีขนาดเล็กซึ่งเป็นส่วนของเส้นใยอาหารมีทั้งโคโลนีสีส้ม แดง ดำ น้ำตาล เขียว และม่วง แต่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ อาจพบการสร้างสปอร์อยู่บนผิวของโคโลนี เห็นเป็นสีดำและเป็นเมือก จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อาจสร้างรงควัตถุสีเหลือง แดง ม่วง หรือดำในอาหารแข็งได้ สปอร์ของ *Micromonospora* ทนความร้อนและความเย็นได้ดี เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20–40 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส ไม่เจริญที่พีเอชต่ำกว่า6 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น gentamycin สารต่อต้านมะเร็ง เช่น calicheamycin (Kawamoto, 1989)

แอคติโนมัยซีตกลุ่ม nocardioform ที่สำคัญคือ *Nocardia* และ *Rhodococcus* ผนังเซลล์ของเชื้อสกุลนี้ประกอบด้วยเปบติโดไกลแคนประเภท A ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสาย N-acetylmuraminic acid เป็น *meso*-DAP มีฟอสโฟลิปิดแบบ PII และอนุพันธ์ของมีนาควิโนนเป็นแบบ MK-8(H_2) , MK-8(H_4) หรือ MK-9(H_2) และยังมีกรดไมโคลิค (mycolic acid) เป็นองค์ประกอบของเซลล์อีกด้วย ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้จัดเป็น acid-alcohol fast ย้อมติดสีได้ดี น้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย อะราบิโนสและกาแลคโตส (Goodfellow, 1989) ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งของ *Rhodococcus* สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร บางช่วงในการเจริญของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนหรือทรงกลม โคโลนีมีได้หลายสีเช่น แดง เหลือง ส้ม ชมพู ครีม น้ำตาล และม่วง มีทั้งผิวเรียบและขรุขระ *Rhodococcus* หลายชนิดสร้างเมือกที่ผิวโคโลนี เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่สร้างสปอร์ nocardioform ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น nocardicin สารต่อต้านไวรัส เช่น sakomycin A นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และเอนไซม์ย่อยสลายอินทรีย์สาร เช่น ฟาง ยาง พลาสติก สารไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น (Czoch, 1988; Goodfellow และคณะ, 1988)

2.2 การแยกเพื่อคัดเลือกเชื้อ

การแยกเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตจากตัวอย่างดินให้ได้ผลดีขึ้น จะต้องกำจัดหรือจำกัดการเจริญของเชื้อรา และการกระจายของแบคทีเรียในอาหารที่ใช้แยก ซึ่งอาจทำได้โดยการควบคุมองค์ประกอบของอาหาร เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในตัวอย่างดินก่อนที่จะนำมาแยกเชื้อ (Porter, 1971) องค์ประกอบของอาหารที่ควบคุมเพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีตเจริญได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น แป้ง กลีเซอรอล และแหล่งไนโตรเจน เช่น casein asparagine และ arginine เป็นต้น (El-Nakeeb และ Lechavalier, 1963) พบว่าการแยก *Streptomyces* จากปุ๋ยหมักโดยใช้ starch casein agar ทำให้เชื้อเจริญได้ดี (Kuster และ William, 1964)

การป้องกันและลดจำนวนเชื้อรา ทำได้โดยเติมสารยับยั้งการเจริญบางอย่างลงไป เช่น sodium propionate 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Crook และคณะ, 1950)

Lawrence (1956) ลดการปะปนของเชื้อราและแบคทีเรียในตัวอย่างดินก่อนจะนำไปแยกเชื้อแอคติโนมัยซีต โดยการเติมสารฟีนอลที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 400 ลงในตัวอย่างดินนาน 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที การนำสารละลายดินไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 1,690 กรัม นาน 20 นาที จะทำให้จุลินทรีย์อื่น ๆ ตกตะกอนยกเว้นแอคติโนมัยซีต (Rechacek, 1971) rose bengal ในปริมาณ 350 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตรจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการกระจายของเชื้อราได้เช่นเดียวกัน (Ottow, 1972)

2.3 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะ

วิธีการคัดเลือกแบบต่าง ๆ ที่นำมาใช้แยกจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว วิธีการศึกษาที่ใช้กันมากในระยะแรก ๆ ก็คือ crowded plate techniques (Waskman, 1959) วิธีนี้ใช้ตรวจหาจุลินทรีย์ในดินที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในดินหลังจากที่บ่มเชื้อไม่เกิน 1 ถึง 2 วัน ซึ่งทำได้โดยการใส่สารละลายของตัวอย่างที่มีเชื้อเจริญอยู่ตามธรรมชาติ (natural substrare) ลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วตรวจหาจุลินทรีย์ที่ให้บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) นอกจากนี้ยังได้พยายามแยกความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ และไม่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยการปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (test organism) ลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เร่งให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะ การปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบนั้นอาจทำได้โดยพ่นทับลงไปบนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ (Stansly, 1974) หรือ water agar suspension ของเชื้อดังกล่าวเททับลงบนผิวหน้า

Kelner (1948) ได้คิดวิธีทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วยชั้นของวุ้น 4 ชั้น (four agar layer plate) ชั้นแรกประกอบด้วยอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ชั้นที่สองประกอบด้วย 0.5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว ซึ่งมีวุ้น 0.25 เปอร์เซ็นต์กับสารละลายดินที่จะให้เชื้อ 30–50 โคโลนีต่อจาน ชั้นที่สามประกอบด้วยชั้นของอาหารวุ้นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10–15 มิลลิลิตร และชั้นที่สี่ จะใช้อาหารวุ้นที่มีสารละลายแบคทีเรีย 3 มิลลิลิตร เททับลงบนผิวหน้า

Lechavalier และ Corke (1953) คิดวิธีตรวจสอบหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยการดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lederberg' s replica plate method (Lederberg, 1952) ซึ่งทำได้โดยใส่ substrateที่เชื้อเจริญอยู่ตามธรรมชาติลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะทั้งหมด ทำซ้ำ 4 ครั้งหรือมากกว่า 1 ใน 4 เก็บไว้ในตู้เย็น ส่วนที่เหลือปลูกด้วยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบตรวจหาเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ เลือกเก็บโคโลนีที่ต้องการไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีการคัดเลือกเชื้อบนอาหารแข็งที่นิยมใช้มากอีกวิธีหนึ่งคือ cross streak plate (Waksman, 1959) วิธีนี้ทั้งเชื้อแอคติโนมัยซีตและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจะเจริญบนอาหารชนิดเดียวกัน เพราะฉะนั้นก็ต้องเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อทั้งสองประเภท Vanek และคณะ (1958) ใช้วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตให้เจริญบนอาหารวุ้น 24 ชั่วโมง แล้วตัดวุ้นที่มีเชื้อเจริญออกเป็นชิ้นวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบการเจริญอยู่

Weinstein และคณะ (1964) พยายามคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสนใจจุลินทรีย์พวกแอคติโนมัยซีตในสกุล *Micromonospora* ซึ่งมีผู้ศึกษาน้อยมาก และพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ หลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีตในสกุลนี้ได้แก่ gentamycin ; everninomicin ; holomicin และ megalomicin การค้นพบนี้ทำให้การค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มุ่งไปทางด้านวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์พวกแอคติโนมัยซีตในสกุลอื่นนอกจาก *Streptomyces* มากขึ้น ในดินจะพบแอคติโนมัยซีตในสกุลอื่นได้น้อยกว่า *Streptomyces* (Nonomura และ Ohara, 1969) แอคติโนมัยซีตที่พบได้ยากนี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะใหม่ ๆ เช่น สกุล *Actinoplanes* (Parenti และ Coronelli, 1979) แต่มักจะมีความสามารถในการผลิตต่ำและการเจริญอย่างช้า ๆ ฉะนั้นการค้นคว้าและพัฒนาเกี่ยวกับจุลินทรีย์พวกนี้จึงเป็นไปได้ยาก (Iwai และ Omura, 1982)

2.4 การเจริญและการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

Bu'Lock และคณะ (1975) เริ่มใช้คำว่า trophophase สำหรับเรียกระยะการเจริญ (growth phase) และใช้ idiophase เรียกระยะที่มีการผลิต idiolites หรือ secondary metabolites เช่น สารปฏิชีวนะ การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะนั้นเป็นลักษณะผันแปรของสิ่งมีชีวิตที่ผลิต และการสูญเสียความสามารถในการผลิตไม่ได้นำมาซึ่งการสูญเสียความสามารถในการเจริญ แต่การผลิตจะเกิดขึ้นภายหลังจากมีการเจริญเกิดขึ้น (Kanoksilpathaw, 1981)

การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะจะเริ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) ของจุลินทรีย์ใน batch culture (Haavik, 1974a, 1974b; Malik และ Vining, 1970) ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบอยู่น้อย ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญช้าผลิตสารปฏิชีวนะได้เหมือนกัน และอัตราการเจริญ (growth rate) ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ก็มีอิทธิพลบ้างเหมือนกันในรูปแบบ (pattern) ของการผลิตในสภาพธรรมชาติ การผลิตสารปฏิชีวนะอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอด เนื่องจากมีอาหารจำกัดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (Gottlieb, 1976) การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น edeine; bacitracin ; gramicidin ; tyrocidines และ polymyxins ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่มีการสร้าง endospore ในแบคทีเรียกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นท่อนและสารบางชนิดเกิดขึ้นในขณะที่มีการสร้างโคนิเดียในพวก *Streptomyces* (Halvorson และคณะ, 1972; Demain และ Pirct, 1979) ซึ่งสารเหล่านี้มีความจำเป็นสำหรับการสร้างสปอร์ หรือเกี่ยวกับการอยู่รอดในช่วงระยะที่มีการงอกของสปอร์ เหตุผลที่

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการค้าโดยไม่ได้รับอนุญาต ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

สอดคล้องกันอย่างเห็นได้ชัด คือ *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ (asporogenic strains) จะไม่สามารถผลิต polymyxins และสารที่มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ และจะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะในสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ด้วยเหมือนกัน (Paulus, 1967)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพของการเลี้ยงเชื้อ ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

Medium Composition	Fermentation Condition
carbon source	pH
nitrogen source	temperature
inorganic phosphate	oxygen
inorganic salts	others
trace metals	
precursors	
inducers	
inhibitors	
others	

ที่มา : Iwai และ Omura (1982)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แหล่งคาร์บอน (carbon source) โดยทั่วไปแล้วกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และในขณะเดียวกันกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon metabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin, 1980) นอกจากกลูโคสแล้วยังมีมอลโตส (moltose) กลีเซอรอล (glyceral) และแป้งที่มีรายงานว่าใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ในการผลิต Hikizimycin ใช้มอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Uchida และคณะ, 1971) ในการผลิต Neo-enactin ใช้ soluble starch 1.5 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (Kondo และคณะ, 1979) ในการผลิต Aabamycin ใช้กลีเซอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ในการทดลองของดารารัตน์ รอดพยาธิ์ พบว่าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา (ดารารัตน์, 2525)

2. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนมีผลอย่างมากในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Ahoronowitz, 1980) โดยทั่วไปนิยมใช้ถั่วเหลืองบด (soybean meal) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารปฏิชีวนะ

Kanoksilapatham (1981) รายงานถึงการใช้ถั่วเหลืองบดละเอียด (soybean powder) เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยในอาหารที่ใช้ศึกษา การสร้างสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* จะให้ผลดีกว่าอาหารที่ใส่เปปโตน และ meat extract เมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารทั้งสองชนิด

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต temenimycin (Shimi และคณะ, 1971)

3. อนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจนและกระบวนการหายใจ เป็นผลให้การเจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง (Weinberg,1973) โดยทั่วไปความเข้มข้นของฟอสเฟตประมาณ 0.3-300 มิลลิโมล ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสนับสนุนการเจริญของเชื้อ แต่ 10 มิลลิโมล เหมาะสมในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Martin, 1977) เมื่อมีความเข้มข้นฟอสเฟตในอาหารสูง พบว่านอกจากจะขัดขวางการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะแล้วยังยับยั้งการเจริญ (Liu และคณะ, 1975)

4. เกลืออนินทรีย์ (inoganic salts) สำหรับเกลืออนินทรีย์ที่นิยมใช้กันทั่วไปเพื่อเริ่มการผลิตสารปฏิชีวนะคือ โซเดียมคลอไรด์ การผลิต Streptomycin โดย *Streptomyces griseus* จะเพิ่มขึ้นถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเติมในปริมาณสูงจะยับยั้งการผลิต

5. โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals) โลหะหลายชนิดจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็น Co-factor ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ได้แก่ V , Cr , Mn , Fe , Co , Ni , Cu , Zn และ Mo สำหรับ Mn , Fe และ Zn มักจะมีบทบาทในการผลิต secondary metabolites (Weinberg, 1962-1970) ซึ่งความต้องการโลหะนั้นอยู่ในปริมาณน้อยมาก และปริมาณโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญจะต่างกัน ความต้องการสำหรับขบวนการผลิตจะมากกว่าความต้องการสำหรับการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า (Iwai และ Omura, 1982)

6. สารตั้งต้น (precursors) การผลิต penicillin G ในปริมาณสูงโดย *Penicillium chrysogennum*จะเกิดขึ้น โดยการเติม phenylacetate เป็นสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์ เพื่อการสังเคราะห์ secondary metabolites ในสิ่งมีชีวิตจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่ำ ด้วยเหตุนี้เมื่อเติม analogs เป็นสารตั้งต้น ในบางครั้งจะมีการใช้สารตั้งต้นนี้ทำให้เกิดผลผลิตชนิดใหม่

7. สารยับยั้ง (inhibitors) สารปฏิชีวนะหลายชนิดเป็นสารยับยั้งขบวนการสังเคราะห์ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้น ๆ

สภาพของการเลี้ยงเชื้อ

1. ความเป็นกรดด่างในอาหาร จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะมากเช่นกัน การรักษาระดับความเป็นกรดด่างในอาหารทำได้โดยการเติม buffering agent เช่น $CaCO_3$, K_2HPO_4 หรือ $NaHCO_3$ (Iwai และคณะ, 1973)

2. ระดับของอุณหภูมิ โดยทั่ว ๆ ไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะจะคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุด แต่อุณหภูมิของการเจริญจะผันแปรในช่วงกว้าง (Iwai และ Omura, 1982) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของพวก thermophilic actinomycetes เช่น thermoactinomyces จะอยู่ในช่วงสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และสำหรับพวก mesophilic actinomycetes จะอยู่ประมาณ 27 องศาเซลเซียส (Weinberg, 1973)

3. ปริมาณออกซิเจน จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ส่วนมากต้องการออกซิเจนในการเจริญ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำนั้นต่ำมาก จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Tuffile และ Pinho, 1970; Brook, 1969; Gaden, 1960)

2.6 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีตในอาหารเหลว

เชื้อแอคติโนมัยซีตที่เจริญในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงแบบเขย่า ส่วนใหญ่มักมีการเจริญแบบที่เส้นใยอัดแน่นเป็นเม็ดกลม ๆ (pellet) โดยเฉพาะเชื้อ Streptomyces ซึ่งแม้จะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่อาจมีลักษณะ pellet ที่แตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับปริมาณ inoculum ที่ใช้ pellet ที่เกิดขึ้นจะจำกัดการขนถ่ายมวลสาร (mass transfer) และทำให้เกิด solute gradient ขึ้นภายใน pellet เซลล์ที่อยู่ในส่วนกลางจะถูกจำกัดธาตุอาหารและเมื่อ pellet เพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น การเจริญก็จะเกิดเฉพาะส่วนพื้นผิวภายนอกเท่านั้น

ปัญหาการเกิด pellet นี้ เกิดขึ้นได้กับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นเส้นใย สำหรับเชื้อราบางชนิดอาจลดปัญหาการเกิด pellet โดยการเติมสารพวก polyanion ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ สารพวกนี้จะไปชักนำให้เกิด electrostatic repulsion ระหว่างสปอร์หรือเซลล์ ซึ่งจะขัดขวางการเกาะกลุ่มกันของสปอร์ใน inoculum ซึ่งจะก่อให้เกิดการจับกันของเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ในขณะที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วย สารพวก polyanion เช่น วุ้น Carbopol และ Junlon ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณน้อย ๆ จะช่วยทำให้เชื้อ Streptomyces มีการเจริญแบบแผ่กระจายได้

2.7 ความหมายของสารปฏิชีวนะ

คำว่า "สารปฏิชีวนะ" (antibiotics) มาจากคำว่า antibiosis ซึ่ง Vuillemin ได้นำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1889 ซึ่งใช้ในความหมายว่า " สภาพของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ขับสารบางอย่างออกมาทำลายการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง " (Pelczar, 1965) ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 ได้เปลี่ยนมาใช้ในความหมายของสารเคมีที่เป็นผลิตผลจากกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ของสิ่งมีชีวิตบางชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้โดยใช้สารความเข้มข้นต่ำ ๆ เท่านั้น (Waksman, 1961)

สารปฏิชีวนะเป็นสารที่ไม่ได้ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ถูกผลิตขึ้นมาเป็นพิเศษในจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ (Bu' lock, 1961; Gottieb, 1976; Katz และคณะ, 1977) ซึ่งผลิตขึ้นโดยขบวนการ secondary metabolite (Walker, 1974) และผลิตขึ้นมาในขบวนการต่าง ๆ มากกว่า primary metabolite ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต จุลินทรีย์บางจำพวกเท่านั้นที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ แบคทีเรียและราบางชนิด (Aharonowitz, 1979)

ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆมากมาย และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้นั้นได้แก่ ราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Bacillus* (บัญญัติ, 2521)

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ คือ เชื้อแอคติโนมัยซีต ในระหว่างปี ค.ศ. 1953 ถึง 1970 อเมริกาและญี่ปุ่นผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีตได้ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อรา 11 เปอร์เซ็นต์ และจากเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ 4.5 เปอร์เซ็นต์ (Gottieb, 1973) และประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มของเชื้อ *Streptomyces* (Kanoksilapathaw, 1981)

2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อรา

สารต่อต้านเชื้อราที่พบในธรรมชาติจากจุลินทรีย์แบ่งตามโครงสร้างได้หลายกลุ่ม โดยมีผลต่อการเจริญของเชื้อราได้เป็น 3 ประเภทด้วยกันคือ มีผลต่อผนังเซลล์ มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และมีผลต่อเอนไซม์ เช่น peptidyl transferase และ topoisomerase II เป็นต้น กลุ่มที่มีผลต่อผนังเซลล์มีสมบัติยับยั้งการสร้างไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47308

polyoxin ซึ่งได้จาก *S. cacaoi* และ nikkomycin ซึ่งได้จาก *S. tendae* สารกลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ มีสมบัติยับยั้งการสร้างไขมันประเภท ergosterol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และออแกเนลของเชื้อรา ทำให้สูญเสียหน้าที่การควบคุมสารผ่านเข้าออกและตายในที่สุด ได้แก่ nystatin ซึ่งได้จาก *S. noursei* piramycin ซึ่งได้จาก *S. natalensis* และ amphotericin B ซึ่งได้จาก *S. nodususi* สำหรับสารกลุ่มที่มีผลต่อเอนไซม์ ได้แก่ cycloheximide ซึ่งได้จาก *S. griseus* มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ peptidyl transferase โดยเกาะกับไรโบโซมหน่วยย่อย 60S ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนและ anthracycline ซึ่งได้จาก *S. peucetus* มีสมบัติยับยั้ง topoisomerase II ขัดขวางการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (Tanaka, 1992)

ดัชนีที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราเรียกค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ในการทดสอบสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการนิยมใช้วิธีวัดความกว้างของวงใส (clear zone) โดยเลี้ยงเชื้อราในจานเพาะเชื้อแล้วทดสอบด้วยสารต่อต้านราแต่ละชนิดเปรียบเทียบกัน หรือใช้กระดาษทดสอบ (paper disc method) โดยใช้กระดาษกรองตัดเป็นแผ่นวงกลมเล็ก ๆ นำไปจุ่มในสารที่ใช้ทดสอบแล้วนำมาวางบนจานเพาะเชื้อที่เทสารแขวนลอยของสปอร์ราลงไปก่อนแล้ว จากนั้นสังเกตผลการยับยั้งการเจริญของราจากความกว้างของวงใสรอบแผ่นกระดาษกรอง อีกวิธีหนึ่งคือ spot inoculation method (Mikami และ Uno, 1988) เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราผลิตจากแบคทีเรีย โดยปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลงบนวุ้นในจานเพาะเชื้อ เมื่อแบคทีเรียเจริญแล้วนำอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราเททับลงไปในจานเพาะเชื้อ แล้วใช้ชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่วางไว้ด้านบนอีกทีเพื่อให้ราเจริญแพร่ลงไป แล้วจึงสังเกตการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสารเมทาโบไลท์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

การตรวจสอบองค์ประกอบพร้อมทั้งประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อรา ที่สกัดจากแอคติโนมัยซีตสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยแยกชนิดของสารต่าง ๆ ออกมาบนแผ่น TLC แล้วทดสอบการเกิดวงใสจากการเทอาหารที่มีเชื้อราลงบนแผ่น TLC (วิธี bioautography) ทำให้ทราบชนิดของสารที่ออกฤทธิ์โดยตรง รวมทั้งสามารถสกัดสารดังกล่าวไปศึกษาและใช้ประโยชน์ต่อไปได้ (Aszalos, 1986)

จากการศึกษาผลของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา มีรายงานว่า Kolomiets และคณะ (1996) ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใย น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ของ *S. flavescens* เจริญอยู่มาตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* ที่ก่อโรคในแตงกวา พบว่าสารสกัดซึ่งได้จากน้ำเลี้ยงซึ่งมีเซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F. oxysporum เจริญอยู่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด และสารสกัดที่ได้จากเส้นใยของ *F. oxysporum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำสุด

ในปี 1996 Ylihonko และคณะ ทำการถ่ายยีน anthracycline จาก *S. nogalator* ไปสู่ *S. lividans* ทำให้ได้สารชนิดใหม่ที่เป็นผลผลิตมาจากสาร intermediate ในขบวนการสังเคราะห์ nogalamycin ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนายาปฏิชีวนะ anthracycline ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ในปี 1998 Kuhnt และคณะ สกัดสารปฏิชีวนะ leptomycin B (LMB) ซึ่งมีสมบัติต่อต้านเชื้อราและมะเร็งจาก *Streptomyces* sp. ATS1287 และชักนำให้เกิด bioconversion ใน *S. rimosus* ATCC 28893 โดยได้ผลผลิตเป็น dihydroxy LMB และ dihydro LMB ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเจริญของ *Aspergillus flavas* และ *Enericella unguis* ไม่แตกต่างกัน

ในปีเดียวกัน Cho และคณะ นำ *S. clavuligerus* NP1 มาทำ bioconversion โดยเปลี่ยน penicillin G ให้เป็น deacetooxycephalosporin G และสามารถเปลี่ยน penicillin อีก 14 ชนิดให้เป็นสารในกลุ่ม deacetoxycephalosporin ได้ในเวลาต่อมา

ในปี 1999 Bormann และคณะ ทดลองโคลนยีนที่สร้างสารต่อต้านเชื้อรา (antifungal protein 1; AFP1) จาก *S. tendae* TU901 ที่สามารถผลิต nikkomycin เข้าสู่ *S. tendae* สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถผลิต nikkomycin พบว่าสายพันธุ์กลายที่โคลนได้มีสมบัติยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* spp. แสดงให้เห็นว่าโปรตีน AFP1 มีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากการศึกษาพบว่า AFP1 ทนต่อพีเอชและอุณหภูมิสูง รวมทั้งทนต่อการย่อยสลายของ proteinase และไม่มีสมบัติเป็นเอนไซม์ AFP1 จัดเป็น chitin-binding protein โดยไปเกาะที่ผิว conidia และเส้นใยของรา ทำให้มีรูปร่างและการเจริญที่ผิดปกติ

Arndt และคณะ (1999) ศึกษาสารต่อต้านเชื้อราจาก *S. hygroscopicus* ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ rapamycin โดยพบว่า *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* สามารถผลิตท็อกซิน FK506 ได้นอกเหนือจาก rapamycin และเมื่อทดสอบด้วย *Cryptococcus neoformans* และ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ต้านทาน rapamycin ปรากฏว่าเชื้อราดังกล่าวไม่สามารถเจริญแข่งขันกับ *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ได้ เนื่องจากท็อกซิน FK 506 ที่ *Streptomyces* ผลิตขึ้น

2.9 สารประกอบโพลีคีไทด์

โพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นองค์ประกอบของสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิพบได้ตั้งแต่แบคทีเรีย เชื้อรา พืช จนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โพลีคีไทด์ที่พบในแอคติโนมัยซีตมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ โดยเป็นองค์ประกอบของสารในกลุ่ม macrolide , tetracycline, anthracycline ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

polyene , polyether เป็นต้น โพลีคีไทด์ที่พบในเชื้อรา เช่น griseofulvin ซึ่งได้จาก *Penicillium griseofulvus* โพลีคีไทด์ที่พบในพืช ได้แก่ flavonoid เป็นรงควัตถุในดอกไม้หลายชนิดซึ่งนำมาใช้แต่งกลิ่นอาหารและเครื่องดื่ม นอกจากนี้สารต่อต้านเชื้อราหลายชนิดในกลุ่ม phytoalexin ที่พืชผลิตก็มีโครงสร้างเป็นโพลีคีไทด์ สารในกลุ่มนี้จึงจัดว่ามีความสำคัญในแง่เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก (Hopwood และ Sherman, 1990; Simpson, 1991) สำหรับโพลีคีไทด์ที่มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราได้แก่ nystatin , candicidin , anthracycline และ amphotericin B เป็นต้น

สารโพลีคีไทด์ในจุลินทรีย์สร้างจากยีนโพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthase ; PKS) แบ่งเป็น 3 ชนิดคือ ชนิดที่ 1 , 2 และ 3 โครงสร้างของโพลีคีไทด์ชนิดที่1 เป็นวงแลคโตนหรือวงแหวนขนาดใหญ่สร้างโดยระบบเอนไซม์ Type I PKS ซึ่งเป็นเอนไซม์มีหลายหน้าที่อยู่รวมกัน (multifunctional enzyme) ได้แก่ erythromycin ผลิตจาก *S. erythreaus* และ tylosin ผลิตโดย *S. fradiae* เป็นต้น (Donadio และคณะ, 1991; Hutchinson และคณะ, 1991) โพลีคีไทด์ชนิดที่ 2 มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกสร้างโดยระบบเอนไซม์ Type II PKS ซึ่งเป็นเอนไซม์แบบหน้าที่เดียว (monofunctional enzyme) ได้แก่ actinorhodin ผลิตจาก *S. coelicolor* และ oxytetracycline ผลิตจาก *S. rimosus* เป็นต้น (Hopwood และ Sherman, 1990) โพลีคีไทด์ชนิดที่ 3 อาศัยการทำงานของระบบเอนไซม์ Type III PKS ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ chalcone synthase ในพืช (Funa และคณะ, 1999)

Antifungal antibiotics ส่วนใหญ่ที่ได้จากสเตรปโตมัยซีตเป็นสารพวก polyene (Ball และคณะ, 1957) และมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ แต่มักจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Norman และคณะ, 1972) มันมีกลไกในการทำลายเชื้อราและยีสต์ได้โดยไปจับกับ sterol ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อราและยีสต์ แล้วมีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ เซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้เป็นปกติ (Hamilton-Miller, 1973) เช่น filipin ซึ่งเป็น pentaene ทำปฏิกิริยากับ cholesterol ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา และปฏิกิริยานี้ทำให้คุณสมบัติด้านสรีรวิทยาของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งทำให้การผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อราเป็นไปได้ไม่ดี (Norman และคณะ, 1972) polyenic antibiotics ที่นำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราและยีสต์ได้แก่ amphotericin B ใช้รักษาโรค histoplasmosis , coccidioidomycosis และใช้ nystatin รักษาโรคติดเชื้อของระบบทางเดินอาหาร โรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อ *Candida* spp. เป็นต้น นอกจากใช้รักษาโรคแล้วยังสามารถนำไปใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์อื่น เช่น การถนอมอาหาร ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนควบคุมและรักษาโรคพืชบางชนิด (Hamilton-Miller, 1973)

สารพวก polyenes ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนหนึ่งเป็น hydrophilic (polyol) และอีกส่วนหนึ่งเป็น hydrophobic (polyene) จึงทำให้มันมีคุณสมบัติคล้ายพวก detergent (Hamilton-Miller, 1973)

polyene เป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยพันธะคู่ (double bond)หลายตำแหน่ง ซึ่งชื่อที่ใช้เรียกขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ (double bond) ที่มี เช่น polyene ที่มีพันธะคู่ (double bond) 5 ตำแหน่ง เรียกว่า pentaene เป็นต้น เนื่องจากการมีพันธะคู่ (double bond) ทำให้สามารถใช้คุณสมบัติของการดูดแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้ (visible light) และแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light) ของสารมาศึกษาคุณสมบัติขั้นต้นในการตรวจสอบว่าสารนั้นเป็น polyene หรือไม่ นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ว่าเป็น polyene กลุ่มใด เช่น triene , tetraene หรือ heptaene เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้คุณสมบัติการดูดแสงก็เป็นเพียงวิธีคร่าว ๆ เท่านั้น ซึ่งนอกจากจะใช้คุณสมบัติการดูดแสงในการศึกษาแล้วยังมีการใช้วิธีการทาง chromatography มาช่วยอีกด้วย สารปฏิชีวนะชนิด polyene มักเป็นสารที่มีสี และสีนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ที่มี ถ้ามีพันธะคู่มากก็จะมีสีเข้มขึ้นเป็นลำดับ (Hamilton-Miller, 1973)

จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะจะถูกทำลายด้วยสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในระยะที่มีการเจริญจึงทำให้จุลินทรีย์มีการผลิตสารปฏิชีวนะหลังจากมีการเจริญแล้ว เพราะระยะหลังจากการเจริญแล้ว จุลินทรีย์ทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้าง โดยกลไกต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารปฏิชีวนะ ดังต่อไปนี้

1. xenotoxic antibiotics เป็นสารที่ยับยั้งหรือฆ่าสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น antimycin ที่ผลิตจาก *Streptomyces antibioticus* ซึ่งเป็นพวกโพรคาริโอต แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของยูคาริโอต โดยมีผลกับลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ที่ไมโทคอนเดรีย (Stater, 1973) anisomycin ที่ผลิตจากเชื้อ *S. roseochromogenes* และ *S. griseolus* จะมีเฉพาะต่อ 80S ribosome ของยูคาริโอต (Barbacid และคณะ, 1974) , β-lactam antibiotics และ polymyxin ที่ผลิตจากแบคทีเรียจะมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยมีผลต่อ uridine diphophogglucosamine binding site ของ chitin syntase (Isono และคณะ, 1969) ดังนั้นสารเหล่านี้จะไม่มีผลกับพวกโพรคาริโอต สิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารประเภทนี้จึงไม่อ่อนแอต่อเมทาโบไลท์ของตัวเอง และไม่จำเป็นต้องมีกลไกในการป้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. autotoxin antibiotics เป็นสารที่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตด้วย เช่น *Streptomyces griseus* ผลิตสเตรปโตมัยซิน และอ่อนแอต่อสารที่ผลิตขึ้นเอง สิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารพวกนี้จะมีวิธีในการป้องกันตัวเองโดยกลไก 3 แบบ

2.1 modification หรือ detoxification ของสารปฏิชีวนะ โดยเอนไซม์ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้น เช่น inactivation ของสเตรปโตมัยซินใน *S. griseus* โดยขบวนการ phosphorylation ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase (Cella, 1975)

2.2 alteration ของ target site สำหรับสารปฏิชีวนะในเซลล์ผู้ผลิต เช่น actinomycin ที่ผลิตจาก *S. antibioticus* และมีผลต่อการสังเคราะห์ RNA พบว่า homologous *in vitro* transcription system ทนทานต่อ actinomycin ได้ดีกว่า heterologous system ที่ใช้ DNA ของ *S. antibioticus* และ RNA polymerase จาก *E. coli* (Vining, 1970)

2.3 การลดการยอมรับสารปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ภายหลังจากขับออกนอกเซลล์แล้ว ปรากฏการณ์นี้พบใน *S. venezuelae* ที่ผลิต chloramphenicol (Ehrilich และคณะ, 1947; Gottieb, 1948)

2.10 ชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส

เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเซลลูโลส มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิดคือ

1. เอนโด-เบต้า-1,4-กลูคาเนส หรือ เบต้า-1,4-กลูแคน กลูคาโนไฮโดรเลส (Endo-β-1,4-glucanase หรือ β-1,4-glucan glucanohydrolase) (EC. 3.2.1.4) หรือเรียกสั้น ๆ ว่าเอนโดรกลูคาเนส คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลส หรือซีเอ็มเซลลูเลส (carboxymethyl cellulase or CM-cellulase)

เอนโดกลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะเบต้า-1,4-ไกลคอไลติค (β-1,4-glycolytic) ที่อยู่บริเวณภายในพอลิเมอร์เซลลูโลสได้ เอนโดรกลูคาเนสที่บริสุทธิ์จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่มีระดับขั้นของการเกิดพอลิเมอร์สูงได้เป็นกลูโคส เซลโลไบโอและเซลโลเด็กซทรินอื่น ๆ ที่ละลายน้ำได้ ผลผลิตในขั้นสุดท้ายจากการไฮโดรไลซ์จะได้กลูโคส เซลโลไบโอส และเซลโลไตรโอสในปริมาณเล็กน้อย

เอนโดรกลูคาเนส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวด้วยกรด (acid-sowllen cellulose) และอนุพันธ์เซลลูโลส (substituted or derivative cellulose) เช่น คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) และไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) ได้ดี แต่ไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึก (crystalline cellulose) ในปริมาณที่จำกัด และไม่ไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสเลย การทำงานของเอนโดรกลูคาเนสจะช่วยทำให้เซลโลไบโอไฮโดรเลสย่อยเซลลูโลสในสภาพผลึกได้ดียิ่งขึ้น ลักษณะการทำงานของเอนโดรกลูคาเนสไปเกื้อหนุนการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลโลไบโอไฮโดรเลสนี้ เรียกว่า ปรากฏการณ์เสริมกันของเซลลูเลส (syner gistic effect of cellulase)

2. เอกโซ-เบต้า-1,4-กลูคาเนส หรือ เบต้า-1,4-กลูแคน เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Exo-β-1,4-glucanase หรือ β-1,4-glucan cellobiohydrolase) (EC. 3.2.2.92) หรือเรียกสั้นๆ ว่าเอกโซกลูคาเนส หรือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส

เซลโลไบโอไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลส โดยไปทำให้ปลายทางด้านที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวซ์(non-reducing end) ของพอลิเมอร์เกิดแตกตัวได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอสเพียงอย่างเดียว เซลโลไบโอสและกลูโคสสามารถยับยั้งการทำงานของเซลโลไบโอไฮโดรเลสได้ แต่กลูโคสจะยับยั้งการทำงานในขอบเขตที่น้อยกว่าเซลโลไบโอส

เซลโลไบโอไฮโดรเลส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่อยู่ในสภาพผลึกได้ดีกว่าเอนโดรกลูคาเนส แต่ไฮโดรไลซ์อนุพันธ์เซลลูโลสในปริมาณที่จำกัด ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงกว่าเอนโดกลูคาเนส นอกจากนี้ยังไฮโดรไลซ์เซลโลเด็กซตรินได้ แต่ไม่ไฮโดรไลส์เซลโลไบโอส

3. เบต้า-1,4-กลูโคซิเดส หรือ เบต้า-ดี-กลูโคไซด์ กลูโคไฮโดรเลส (β-1,4-glucosidase หรือ β-D-glucoside glucohydrolase) (EC. 3.2.1.21) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า เบต้า-กลูโคซิเดส หรือเซลโลไบเอส

เบต้า-กลูโคซิเดสมีบทบาทสำคัญในการไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสที่เป็นผลผลิตจากการย่อยพอลิเมอร์ของเซลลูโลส ได้ผลผลิตขั้นสุดท้ายเป็นกลูโคส นอกจากนั้นยังมีความสำคัญต่อการควบคุมการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เซลลูเลส และต่อการควบคุมการย่อยเซลลูโลส เบต้า-กลูโคซิเดสที่เซลล์สร้างขึ้นจะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสนอกเซลล์ไปเป็นกลูโคส ซึ่งจะไปควบคุมระดับของกลูโคสและเซลโลไบโอสที่อยู่ในเซลล์ อันจะไปมีผลต่อชีวสังเคราะห์เซลลูเลสโดยผ่านกลไกการเหนี่ยวนำและการกดดัน

นอกเหนือจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดหลัก ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังพบเอนไซม์กลูแคน กลูโคไฮโดรเลส (glucan glucohydrolase หรือ 1,4-β-D-glucan glucohydrolase) (EC. 3.2.1.74) อยู่ในระบบเซลลูเลสด้วยเอนไซม์นี้ ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายหน่วยกลูโคสออกไปจากทางปลายที่ไม่ได้เป็นตัวรีดิวซ์ของสายโซ่ เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่พองตัวอันเนื่องมาจากกรดฟอสฟอริก เซลโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ และคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การสังเคราะห์เซลลูเลส (cellulase biosynthesis)

การสังเคราะห์เซลลูเลสของเชื้อราจะถูกควบคุมด้วยกลไกการเหนี่ยวนำการกดดัน (induction-repression mechanism) โดยเซลล์ของเชื้อราจะทำการสร้างเซลลูเลสออกนอกเซลล์ขึ้นมาก็ต่อเมื่อมีสับสเตรทที่เหมาะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสังเคราะห์เซลลูเลสนอกเซลล์ที่เกิดขึ้นหลังจากมีการเหนี่ยวนำจะถูกยับยั้งได้เมื่อมีกลูโคสหรือน้ำตาลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูเลส ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

- กลไกการขนส่งที่ควบคุมการขับเซลลูเลสออกนอกเซลล์
- ระบบเอนไซม์ขนส่ง และ/หรือ ระบบไกลโคซิเดส ที่ควบคุมการขนส่งและการใช้ตัวเหนี่ยวนำพอแทนเชียล (potential inducer)
- ระบบการขนส่งและกลูโคซิเดสที่ยึดจับอยู่ที่เยื่อเซลล์ จะเป็นตัวควบคุมปริมาณของตัวเหนี่ยวนำแอคทีฟ (active inducer)
- สัมพรรคภาพระหว่างตัวเหนี่ยวนำ และตัวกดดัน (affinity of inducer-repressor) จะเป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพของการเหนี่ยวนำ ในขณะที่การกดดันแคเทบอไลท์ และครึ่งชีวิตของ m-RNA จะเป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพที่แท้จริงของการถอดรหัสและการแปลรหัส
- ปริมาณกลูโคสและกลูโคโนแลคโตน (ผลผลิตที่ได้จากการออกซิเดชันกลูโคส) ในเซลล์ จะมีผลต่อประสิทธิภาพของกลูโคซิเดสในเซลล์

2.12 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control หรือ biocontrol)

การเพาะปลูกพืชส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ จึงมีการนำสารเคมีมาใช้ เนื่องจากสารเคมีมีข้อดีคือ ออกฤทธิ์รวดเร็ว มีประสิทธิภาพแน่นอน และเห็นผลชัดเจน สะดวกในการจัดซื้อ การใช้ และการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามข้อเสียบางประการของการใช้สารเคมีก็คือ ต้องใช้ประจำและต่อเนื่องทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และบางกรณีอาจเกิดการดื้อยาของเชื้อ ทำให้ต้องเพิ่มอัตราการใช้สารเคมี หรือเปลี่ยนชนิดของสารเคมีควบคุมโรคพืชแล้วปัญหาโรคพืชไม่ลดลงเท่าที่ควร หรือโรคพืชบางชนิดไม่สามารถใช้สารเคมีควบคุมได้ หรืออาจควบคุมได้บ้างแต่ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้การใช้สารเคมีในปริมาณมากและต่อเนื่องมักทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เกิดสารพิษตกค้างในดิน น้ำ แม้กระทั่งแหล่งน้ำใต้ดินทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมีสารพิษตกค้างไปด้วย ทำให้สมดุลของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในดินตามธรรมชาติเสียไป ปริมาณจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ลดลง จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดังกล่าว ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรียวัตถุ ซึ่งช่วยทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในธรรมชาติ บางชนิดช่วยตรึงแร่ธาตุจากดิน น้ำ และอากาศ ซึ่งมีประโยชน์โดยตรงต่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูหรือปฏิปักษ์ต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืช การลดลงของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) เป็นสาเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มจำนวนขึ้นและเกิดการระบาดของโรคได้มากยิ่งขึ้น (จิระเดช, 2538ง) ทำให้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้รับความสนใจจากนักวิชาการ

การควบคุมโดยชีววิธี หมายถึง การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตลอดจนสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก พันธุกรรม และผลผลิตจากพันธุกรรม (gene product) ในการลดปริมาณและลดกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืชลงจนทำให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีการอย่างหนึ่งในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (integrated pest management) การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน คือ การใช้วิธีที่ให้ผลดีสูงสุดทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ความปลอดภัย และความยั่งยืน ซึ่งเป็นการรวนเอาวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และชีวภาพเข้าไว้ด้วยกันเพื่อควบคุมผลที่เกิดจากศัตรูพืช และส่งเสริมปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตจากพืชและสัตว์

ตัวอย่างการทำวิจัยเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในการป้องกันกำจัดโรคพืช (จิระเดช, 2538จ ; จิระเดช และบรรเจิด, 2529 ; จิระเดช และวรรณวิไล, 2534 ; องอาจ และคณะ, 2534 ; จิระเดช และคณะ, 2536 ; สุธามาศ และคณะ, 2537; สุภาพร และคณะ, 2537 ; บรรเจิด และจิระเดช, 2529) การใช้เชื้อรา *Chaetomium* sp.ในการป้องกันกำจัดโรคพืช (เกษม, 2532ก.2534 ; เกษม และชลฎา, 2536) การใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดโรคพืช (ช่อทิพย์, 2538 ; นิพนธ์, 2538 ; มณจันทร์ และชัยวัฒน์, 2537 ; มานะ และคณะ, 2536 ; ปริญญา และคณะ, 2533 ; สุภกิจ, 2536 ; อุรัจฉทา และคณะ, 2535) การใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช (วัชรี, 2538 ; วัชรี และพิมลพร, 2535) การใช้เชื้อไวรัสควบคุมแมลงศัตรูพืช (อุทัย, 2538) การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* กำจัดหนอนแมลงศัตรูพืช (จริยา, 2538 ; อัจฉรา, 2538) การใช้เชื้อราควบคุมไส้เดือนฝอยที่ก่อโรค (Sukjaimit และ Sonthirut, 1998) และการใช้เชื้อรา *Aphanomyces* ควบคุมผักตบชวา (สัมฤทธิ์ และคณะ, 2542) เป็นต้น

2.13 กลไกการควบคุมโรคพืชของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

Singh และ Faull (1988) แบ่งกลไกการควบคุมโรคของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ออกเป็น 3 ลักษณะคือ

1. การแข่งขัน (competition) เพื่อแย่งแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัย

2. การเป็นไมโคพาราสิต (mycoparasitism) หรือไฮเปอร์พาราสิต (hyperparasitism) โดยราชนิดหนึ่งสามารถเป็นปรสิตของราอีกชนิดหนึ่งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่ระเหยได้ (volatile antibiotic) และชนิดที่ระเหยไม่ได้ (nonvolatile antibiotic) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจใช้กลไกอย่างใดอย่างหนึ่งในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช หรือใช้หลายกลไกในการทำงานร่วมกัน

การแข่งขัน (competition)

เกิดขึ้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดหรือมากกว่า มีความต้องการในแหล่งที่จะมาสนับสนุนในการดำรงชีพจากแหล่งเดียวกัน แหล่งที่จะมาสนับสนุนในการดำรงชีพ หมายถึง สารอาหาร อากาศ และพื้นที่อาศัย

การเป็นไมโคพาราสิต (mycoparasitism)

เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไฮเปอร์พาราสิต (hyperparasitism) เป็นปรากฏการณ์ที่เชื้อราชนิดหนึ่งเป็นปรสิตของเชื้อราอีกชนิดหนึ่ง โดยการเจริญของเส้นใยเชื้อราชนิดหนึ่งปกคลุมและเจาะทะลุเส้นใยของเชื้อราอีกชนิด ด้วยเส้นใยพิเศษที่เรียกว่า haustoria และย่อยสลายเส้นใยราชนิดนั้นเป็นอาหาร อาจแบ่งปฏิกิริยาไมโคพาราสิตออกเป็น 2 ชนิด คือ biotrophic และ necrotrophic โดยพิจารณาจากรูปแบบของปฏิกิริยาการเป็นปรสิต biotrophic คือการได้มาของสารอาหารจากเซลล์ที่มีชีวิตของ host โดยผ่านทาง haustoria ส่วน necrotrophic นั้นคือการทำลายหรือย่อยสลายเซลล์ของ host ให้ตายลงด้วยสารพิษ หรือ extracellular enzyme ที่สร้างขึ้นก่อนนำไปใช้เป็นแหล่งอาหาร

การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

เป็นลักษณะที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ หรือสารที่ได้จากการเมตาบอลิซึมที่ไปมีพิษโดยตรงต่อจุลินทรีย์อีกชนิด

2.14 ชีวภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืช

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้รับความสนใจอย่างมาก ในแง่ของการทดลองการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชที่มีปัญหาเหล่านั้น มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาขึ้นจนผลิตเป็นเชิงการค้าในประเทศต่าง ๆ เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช จนสามารถผลิตเป็นเชิงการค้าได้สำเร็จแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อราและแบคทีเรีย

1. ชีวภัณฑ์ที่เป็นเชื้อรา

ที่นิยมได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. และ *Chaetomium* sp.

2. ชีวภัณฑ์ที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย

ชีวภัณฑ์ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีการผลิตเพื่อควบคุมโรคพืช คือ *Bacillus* sp. , *Pseudomonas* sp. และ *Streptomyces* sp. (จิระเดช, 2538ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.15 เชื้อราสาเหตุโรคพืช

ลักษณะของเชื้อราทั่วไปจะเป็นเส้นใยคล้ายเส้นด้ายละเอียด เส้นใยแต่ละเส้นมีขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น จะเห็นได้เมื่อมีการเจริญเป็นกลุ่มก้อนหรือเป็นกลุ่มโคโลนีของเส้นใย เชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่สร้างหน่วยขยายพันธุ์ เรียกว่า สปอร์ เพื่อใช้ในการแพร่ระบาดและการมีชีวิตรอดในระบบนิเวศ สปอร์ของเชื้อรามีหน้าที่คล้ายเมล็ดพันธุ์พืช นั่นคือพร้อมที่จะเจริญและงอก แต่เป็นการเจริญแพร่พันธุ์และงอกได้ในพืช สปอร์เหล่านี้พร้อมที่จะระบาดจากพืชในพื้นที่หนึ่งไปสู่อีกพื้นที่หนึ่ง โดยมีลม น้ำ หรือมนุษย์เป็นสิ่งสำคัญในการพัดและ/หรือพาไป เมื่อสปอร์เหล่านี้ไปสู่พืชพรรณชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสม สปอร์จะเจริญและงอกเข้าไปในพืชโดยการแทงผ่านผิวพืชเข้าไปในพืชได้โดยตรง หรืองอกแล้วแทงผ่านเข้าไปตามแผลที่เกิดขึ้นตามส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือเข้าตามช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ เมื่อเข้าไปแล้วเชื้อราพวกนี้ก็จะมีการสร้างสารพิษ เอนไซม์ หรือสารกระตุ้นต่าง ๆ ทำลายพืชให้ได้รับความเสียหาย เกิดการเปลี่ยนแปลงผิดปกติไป ปัจจุบันมีการผลิตสารเคมี เรียกว่า สารควบคุมเชื้อราโรคพืช หรือ fungicides ใช้ฉีดพ่นทั้งในลักษณะป้องกันและรักษาก่อนและหลังจากที่พืชเป็นโรค

ในกลุ่มของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เชื้อราจัดเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด มีเชื้อรามากกว่า 8,000 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืช และมีพืชชั้นสูงและหรือพืชผลทางการเกษตรเกิดโรค เนื่องจากเชื้อราไม่น้อยกว่า 100,000 โรค เชื้อราสามารถแพร่ระบาดไปตามที่ต่าง ๆ ได้โดยติดไปกับซากพืชเป็นโรค เมล็ดและ/หรือท่อนพันธุ์ ดิน ปุ๋ยคอก หรือวัสดุปลูกต่าง ๆ รวมทั้งแพร่ไปกับน้ำและปลิวไปกับลมได้ดี

สำหรับโรคของพืชป่าไม้ในประเทศไทย พบว่ามีเชื้อราที่เป็น microfungi จำนวนมากที่สามารถเข้าทำลายพืชป่าไม้ได้ตั้งแต่ระยะเมล็ด กล้าไม้ และส่วนต่าง ๆ ของลำต้น ได้แก่ ใบ กิ่งก้าน ลำต้น และฝัก โดยขณะนี้พบเชื้อราประมาณ 92 ชนิด จากเมล็ดไม้ 47 ชนิด ; 72 ชนิด จากกล้าไม้ 40 ชนิด และประมาณ 29 ชนิด จากไม้ใหญ่ 9 ชนิด โดยเชื้อราสาเหตุโรคพืชป่าไม้ที่หลากหลายเหล่านี้สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะอาการต่าง ๆ ของโรคได้ เช่น โรคเน่าคอดิน (damping off) , ราสนิม (rust) , ราแป้ง (powdery mildew) , จุดนูนดำ (tar spot) , ใบไหม้ (leaf blight) , ยอดตาย (dieback) , แผลแตกตามลำต้น (canker) ฯลฯ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งดินที่ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีต

1. บริเวณรอบ ๆ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและใกล้เคียง
2. เขาเขียว จังหวัดชลบุรี
3. จำปาสัก ประเทศลาว
4. สวนส้ม จังหวัดฉะเชิงเทรา นครปฐม นครนายก ปทุมธานี
5. บริเวณจังหวัดฉะเชิงเทรา
6. น้ำตกผาดอกเสี้ยว ดอยสุเทพ (กิ่วแม่ปาน ทางเดินน้ำตกตาดน้อย) ดอยปุย จุดชมวิวน้ำตกวชิรธาร ดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
7. บริเวณจังหวัดนครปฐม
8. บริเวณจังหวัดชลบุรี
9. เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา
10. ช่องเม็ก ชายแดนไทย-ลาว จังหวัดอุบลราชธานี
11. บาราฮาลา พรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส
12. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
13. บ่อกุ้ง จังหวัดนครปฐม
14. บริเวณจังหวัดพระนครศรีอยุธยา
15. บริเวณจังหวัดนนทบุรี
16. ผาแต้ม จังหวัดอุบลราชธานี
17. เหวนรก เขาใหญ่ จังหวัดปราจีนบุรี
18. โป่งน้ำพุร้อน จังหวัดกาญจนบุรี
19. ลำปีล๊อก จังหวัดกาญจนบุรี

วิธีการเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ โดยเลือกเก็บเฉพาะผิวหน้าดินซึ่งมีความลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร โดยดินที่เก็บมาทั้งหมดก่อนนำมาแยกเชื้อจะต้องวางผึ่งลมให้แห้งในที่ร่ม และบดให้ละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีต

1. เตรียมสารละลายของดิน โดยชั่งดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายของดินแต่ละตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่จะแข่งขันการเจริญกับเชื้อแอคติโนมัยซีต

3. ทำการเจือจางสารละลายของดินแต่ละตัวอย่าง ที่ระดับความเจือจาง $10^{-2} - 10^{-5}$ เท่า

4. ปีเปตสารละลายของดินที่เตรียมไว้ ที่อัตราการเจือจาง $10^{-3} - 10^{-5}$ เท่า ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารดัดแปลง starch casein agar (ภาคผนวก ก) จานละ 0.1 มิลลิลิตร อัตราการเจือจางละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำการกระจายเชื้อโดยวิธี spread plate (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

5. ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต โดยเลือกโคโลนีที่ทึบแสง ซึ่งอาจมีสีเทา เขียว ม่วง ชมพู แดง ส้ม หรือ สีเหลือง ที่มีลักษณะเป็นปุยคล้ายกำมะหยี่เมื่อมองด้วยตาเปล่า หรือโคโลนีคล้ายหนังสัตว์ หรือโคโลนีทึบแสงที่ผิวหน้าย่นขรุขระที่ขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยวิธี cross streak technique (ภาคผนวก ข)

6. ทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของแอคติโนมัยซีตที่แยกได้ โดยถ่ายเชื้อเพื่อเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง starch-casein agar ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้

1. การตรวจดูการสร้างสีของเชื้อแอคติโนมัยซีต โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตให้เจริญบนอาหารดัดแปลง starch-casein agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วบันทึกลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี สีของสปอร์ รวมทั้งสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (diffusable pigment)

2. การตรวจดูลักษณะของเส้นใยและลักษณะของสปอร์ โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตบนอาหารดัดแปลง starch casein agar โดยขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเป็นแนวยาวตรงกลางของจานเพาะเชื้อ ใช้กระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 4 แผ่น วางเสียบลงไปบนผิวหน้าอาหารให้เอียงทำมุมประมาณ 45 องศาเซลเซียส โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่เสียบไว้มาย้อมสีแกรม (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิด โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีตในอาหารแข็ง

1. เตรียมกล้าเชื้อของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger* , *Peranophythora lichi* และ *Lasiodiplodia theobromae* โดยเขี่ยเชื้อราวางบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง

2. เตรียมกล้าเชื้อของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้ โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อมา streak ลงบนผิวหน้าอาหารดัดแปลง starch-casein agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง PDA กับ starch-casein agar ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ใช้แท่งเจาะเชื้อ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงในจานเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วนำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมที่เตรียมไว้ จากนั้นใช้แท่งเจาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงในจานเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วนำไปวางเป็น 4 จุด โดยให้มีระยะห่างจากจุดกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา3-5 วัน สังเกตผลโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้ง (clear inhibition) ที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลองที่วางไว้ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือกได้โดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งใช้โปรแกรม Static Package for Social Science (SPSS) ในการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข)

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีต

เลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีบริเวณยับยั้งสูงสุดจากการทดสอบในอาหารแข็งข้างต้น จำนวน 10 เชื้อ มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลส (www.calvin.biotech.wisc.edu/jeff/faq/cellulase.htm/) (ภาคผนวก ข)

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีตและการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

นำเชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา จากการคัดเลือกเชื้อในขั้นตอนข้างต้นมาศึกษาถึงการเจริญเติบโตและการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว โดยถ่ายกล้าเชื้อแอคติโนมัยซีต 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว starch-casein ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 โดยใช้ 1N NaOH และ 1N H_3PO_4 (กล้าเชื้อเตรียมจากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือกไว้เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 6 และ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์หา

- น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข)
- ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ข)
- ปริมาณแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีวัดค่าสี ดัดแปลงจากวิธีของ Mahin และ Carr (1923) (ภาคผนวก ข)
- กิจกรรมของสารปฏิชีวนะ โดยวิธี Kirby-Bauer Test (paper disc) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตจากดินตัวอย่าง

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตจากดินตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยสุ่มเลือกโคโลนีที่มีลักษณะไม่เหมือนกันจากดินแต่ละตัวอย่าง พบว่าในดินแต่ละตัวอย่างจะมีเชื้อแอคติโนมัยซีตอยู่เป็นจำนวนมากบ้าง น้อยบ้าง หรือบางตัวอย่างไม่พบเชื้อแอคติโนมัยซีตเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบในดินนั้นๆ ซึ่งสามารถรวบรวมเชื้อแอคติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 96 ไอโซเลท ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติ

รหัสเชื้อ	อัตราการเจือจาง	สถานที่เก็บ	ลักษณะดิน	ลักษณะเชื้อ
Sam1	10^{-4}	ริมคลิ่ง ลานพระจอม กทม.	ดินสีดำ แฉะน้ำ	โคโลนีสีนวลย่น หยุ่น ๆ
Sam2	10^{-5}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีม่วงดำ แห้ง แข็ง
Sam3	10^{-5}	จำปาสัก ลาว	ดินสีดำ ป่น เป็นผง	โคโลนีสีเหลือง ย่น แห้ง
Sam4	10^{-4}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินปนทราย มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีเหลือง แข็ง นูน สปอร์สีขาว
Sam5	10^{-5}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีขาวม่วง แข็ง ย่น
Sam6	10^{-5}	หอพักสจล. หน้าตึก5 กทม.	ดินร่วนดำ มีเศษใบไม้ รากพืชปน	โคโลนีสีเทา แห้ง ย่น
Sam7	10^{-4}	สวนส้ม ฉะเชิงเทรา	ดินเหนียว แฉะ	โคโลนีสีขาวอมชมพู เป็นคอก ๆ
Sam8	10^{-4}	ป่ากระถิน ฉะเชิงเทรา	ดินสีน้ำตาลเข้มแห้ง มีเศษใบไม้ปน	โคโลนีสีน้ำตาลปนขาว เป็นจุด ๆ
Sam9	10^{-4}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินดำ แฉะ	โคโลนีสีกาแฟ ย่น
sam10	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง ป่น มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีเหลือง ย่น สปอร์สีขาว
sam11	10^{-3}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง ป่น มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีครีม ย่น
sam12	10^{-4}	คณะเกษตร สจล.	ดินสีน้ำตาล แห้ง แข็ง	โคโลนีสีขาวแห้ง นูน
sam13	10^{-4}	ใต้ต้นเฟื่องฟ้า สวนลาดกระบัง กทม.	ดินสีน้ำตาลร่วนซุย แห้ง	โคโลนีสีเหลือง ย่น สปอร์สีขาว
sam14	10^{-4}	หอพักสจล. หน้าตึก5 กทม	ดินสีดำร่วน มีเศษใบไม้ปน	โคโลนีสีน้ำตาลแห้ง ย่น
sam15	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง ป่น มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีนวล ย่น
sam16	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง ป่น มีเศษรากพืชปน	โคโลนีน้ำตาลอมม่วง
sam17	10^{-4}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีเขียวแห้ง
sam18	10^{-3}	ใต้ต้นลิ้นจี่ นครปฐม	ดินสีน้ำตาลดำ ชื้น	โคโลนีสีเหลืองแห้ง สปอร์สีขาวเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อัตราการเจือจาง	สถานที่เก็บ	ลักษณะดิน	ลักษณะเชื้อ
sam19	10^{-5}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาวดอก มีรอยแตกตรงกลาง
sam20	10^{-4}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีเทา
sam21	10^{-4}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาวแห้ง แข็ง
sam22	10^{-5}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีขาวม่วง แห้ง แข็ง
sam23	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีส้มแห้ง แข็ง
sam24	10^{-5}	ป่ากระถิน ฉะเชิงเทรา	ดินแห้ง สีน้ำตาลเข้มมีเศษใบไม้ปน	โคโลนีสีม่วงเข้มแห้ง
sam25	10^{-5}	สนามเด็กเล่น สวนลาดกระบัง	ดินสีน้ำตาลร่วนซุย มีเศษใบไม้ปน	โคโลนีสีม่วงดำแห้ง แข็ง
sam26	10^{-3}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาวแห้ง นูนเล็กน้อย
sam27	10^{-5}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาวแห้ง เป็นจุดเล็ก ๆ
sam28	10^{-4}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีเหลืองนวล
sam29	10^{-5}	ป่ากระถิน ฉะเชิงเทรา	ดินแห้ง สีน้ำตาลเข้มมีเศษใบไม้ปน	โคโลนีสีขาวแห้ง นูนเล็กน้อย
sam30	10^{-5}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีเขียวแห้ง เป็นจุดเล็ก ๆ
sam31	10^{-4}	กระถางต้นไม้ หน้าตึกpower สจล.	ดินสีดำ มีแกลบและขี้เถ้าปน	โคโลนีสีน้ำตาลแห้ง ย่น นูน
sam32	10^{-5}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาว เป็นดวงนูน
sam33	10^{-3}	น้ำตกผาดอกเสี้ยว เชียงใหม่	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีน้ำตาลเป็นมัน
sam34	10^{-5}	กิ่วแม่ปาน ยินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำ แห้ง มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีขาวนูน สร้างpigmentดำ
sam35	10^{-3}	บ้านนาฏอนงค์ เจริญสันติสุข ชลบุรี	ดินสีน้ำตาลอ่อน แห้ง เป็นก้อนแข็ง	โคโลนีสีม่วง สปอร์สีขาว
sam36	10^{-5}	ใต้ต้นกระดุมทอง ลานพระจอม	ดินสีดำ ร่วน ชื้น มีมด	โคโลนีสีขาวอมเหลือง เป็นจุด ๆ
sam37	10^{-5}	ริมตลิ่ง ลานพระจอม	ดินสีดำ แฉะ	โคโลนีสีชมพูแห้ง สปอร์สีขาว
sam38	10^{-4}	ดอยสุเทพ เชียงใหม่	ดินสีดำ ชื้น	โคโลนีสีเหลืองอ่อน สปอร์สีขาว
sam39	10^{-3}	ใต้ต้นแก้ว คณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล	โคโลนีสีขาว สปอร์สีน้ำตาลแห้ง
sam40	10^{-4}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินปนทราย มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีขาว สปอร์สีเทา
sam41	10^{-5}	เขื่อนลำตะคอง โคราช	ดินสีดำ ชื้น	โคโลนีสีขาวแห้ง(cholking)
sam42	10^{-3}	ดินจากรองเท้านารีเหลืองอุดร ประเทศลาว	ดินสีดำปนเศษใบไม้	โคโลนีสีขาวแห้ง เป็นจุด ๆ
sam43	10^{-3}	เขื่อนลำตะคอง โคราช	ดินสีดำ ชื้น	โคโลนีสีเหลืองครีมสปอร์สีน้ำตาล
sam44	10^{-3}	ทางเดินธรรมชาติ กิ่วแม่ปาน	ดินสีดำแห้ง ป่น มีเศษรากพืชปน	โคโลนีสีชมพู เป็นจุดเล็ก ๆ
sam45	10^{-3}	บาลาฮาลา นราธิวาส	ดินเนื้อละเอียด สีน้ำตาลแดง	โคโลนีสีขาว สปอร์สีน้ำตาลอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อัตราการเจือจาง	สถานที่เก็บ	ลักษณะดิน	ลักษณะเชื้อ
sam46	10^{-3}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีเหลือง สปอร์สีเขียวอ่อน
sam47	10^{-4}	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ดินปน สีน้ำตาลแห้ง	โคโลนีสีเหลืองอ่อนสปอร์สีขาวอมฟ้า
sam48	10^{-5}	บ่อกุ้ง นครปฐม	ดินสีน้ำตาลอ่อน แฉะ เค็ม	โคโลนีสีขาว สปอร์สีขาวเทาย่น
sam49	10^{-5}	นาข้าว บ. Algotech นครปฐม	ดินโคลนสีดำ แฉะ	โคโลนีสีขาว สปอร์สีขาว เป็นผง
sam50	10^{-4}	ดินหอพัก สจล. หน้าตึก5	ดินร่วนดำ มีเศษใบไม้ รากพืชปน	โคโลนีสีขาวแห้ง
sam51	10^{-4}	ใต้ต้นเฟื่องฟ้า สวนลาดกระบัง	ดินสีน้ำตาลร่วนซุย แห้ง	โคโลนีสีเหลืองนวล สปอร์สีขาว
sam52	10^{-5}	กระถางต้นไม้ หน้าตึกpower สจล.	ดินสีดำ มีแกลบและขี้เถ้าปน	โคโลนีสีขาวเป็นดอก สปอร์สีม่วง
sam53	10^{-3}	สวนส้มรังสิต ปทุมธานี	ดินสีดำ แข็ง	โคโลนีสีชมพู สปอร์สีน้ำตาล
sam54	10^{-4}	ใต้ต้นพิกุล หน้าคณะวิทย์ สจล.	ดินสีน้ำตาลเข้ม ร่วน มีเศษใบไม้	โคโลนีสีเหลือง สปอร์สีขาว
sam55	10^{-3}	ดอยปุย เชียงใหม่	ดินจับกันเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	โคโลนีสีเหลืองแห้ง ๆ สปอร์สีขาวเทา
sam56	10^{-5}	อยุธยา	ดินสีดำ ร่วน ชื้น	โคโลนีสีขาว สปอร์สีม่วงเทา
sam57	10^{-3}	พรุโต๊ะแดง นราธิวาส	ดินสีน้ำตาลอ่อน มีเศษกิ่งไม้ปน	โคโลนีสีขาว ขอบสีเขียว สปอร์เขียว
sam58	10^{-4}	ใต้ต้นมะนาว นครปฐม	ดินร่วนสีน้ำตาลดำ ชื้น	โคโลนีสีน้ำตาลแดง
sam59	10^{-4}	สวนส้ม นครปฐม	ดินสีดำ ร่วน มีวัชพืชปน	โคโลนีสีส้มแดง
sam60	10^{-5}	สวนส้ม นครนายก	ดินสีน้ำตาล ร่วน มีวัชพืชปน	โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน
sam61	10^{-4}	โรงงานอุตสาหกรรมวิวัฒน์ นนทบุรี	ดินสีดำร่วน มีแกลบปน	โคโลนีสีชมพูอ่อน
sam52	10^{-4}	โรงงานอุตสาหกรรมวิวัฒน์ นนทบุรี	ดินสีดำร่วน มีแกลบปน	โคโลนีสีเหลือง สปอร์สีน้ำตาลอ่อน
sam63	10^{-5}	จุดชมวิว น้ำตกวชิรธาร เชียงใหม่	ดินสีน้ำตาล แข็ง ปนทราย	โคโลนีสีเหลืองนวล สปอร์สีขาว
sam64	10^{-3}	จุดชมวิว น้ำตกวชิรธาร เชียงใหม่	ดินสีน้ำตาล แข็ง ปนทราย	โคโลนีสีน้ำตาลแดง
sam65	10^{-5}	จุดชมวิว น้ำตกวชิรธาร เชียงใหม่	ดินสีน้ำตาล แข็ง ปนทราย	สร้างเม็ดสีสีน้ำตาล สปอร์สีน้ำตาล
sam66	10^{-4}	ใต้ต้นโหระพา นครปฐม	ดินสีน้ำตาลเข้ม มีวัชพืชปน	โคโลนีสีขาว สปอร์สีเทาเข้ม
sam67	10^{-5}	ทางเดินน้ำตกตาดน้อย อินทนนท์	ดินร่วนสีดำ แห้ง ปนทราย	โคโลนีสีขาวแห้ง
sam68	10^{-5}	ทางเดินน้ำตกวชิรธาร เชียงใหม่	ดินสีน้ำตาล แข็ง	โคโลนีสีน้ำตาลเข้ม
sam69	10^{-5}	จำปาสัก ลาว	ดินร่วนสีดำ มีเศษใบไม้ รากไม้ปน	โคโลนีสีเทาแห้ง
sam70	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินร่วนปนทราย แห้ง สีน้ำตาลดำ	โคโลนีสีเทา เม็ดสีสีชมพูแดง
sam71	10^{-4}	กิ่วแม่ปาน อินทนนท์ เชียงใหม่	ดินสีดำเป็นผง แข็ง มีรากไม้ปน	โคโลนีสีเหลือง

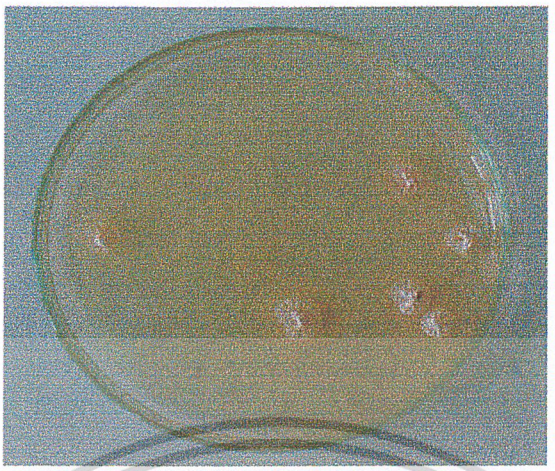
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	อัตราการเจือจาง	สถานที่เก็บ	ลักษณะดิน	ลักษณะเชื้อ
sam72	10^{-4}	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ดินป่น สีน้ำตาลแห้ง	โคโลนีสีเหลือง สปอร์สีเทา
sam73	10^{-5}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีขาวม่วง แข็ง
sam74	10^{-3}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีเทา แห้ง
sam75	10^{-3}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีม่วงดำ แข็ง
sam76	10^{-5}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีน้ำตาลม่วง
sam77	10^{-4}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ ปนทราย	โคโลนีสีชมพูอ่อน แข็ง
sam78	10^{-3}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ แห้ง	โคโลนีสีเขียวแห้ง
sam79	10^{-5}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีน้ำตาล มีเศษรากไม้ปน	โคโลนีสีสีเหลืองแห้ง เป็นดอก
sam80	10^{-4}	เขาเขียว ชลบุรี	ดินร่วนสีดำ มีเศษรากไม้ปน	โคโลนีสีขาวอมม่วง สปอร์สีขาว
sam81	10^{-5}	เหวนรก ปราจีนบุรี	ดินสีดำ แฉะ มีเศษรากไม้ปน	โคโลนีสีขาว สปอร์สีเทาเป็นจุด ๆ
sam82	10^{-5}	บ่อกุ้ง นครปฐม	ดินสีน้ำตาลอ่อน แฉะ เค็ม	โคโลนีสีขาว สปอร์สีเทาดำ
sam83	10^{-4}	เหวนรก ปราจีนบุรี	ดินสีน้ำตาลดำ แฉะ	โคโลนีสีน้ำตาล สปอร์สีเทาย่น
sam84	10^{-4}	เหวนรก ปราจีนบุรี	ดินสีน้ำตาลเข้ม ชื้น ปนทราย	โคโลนีสีเหลืองนวล
sam85	10^{-4}	เหวนรกปราจีนบุรี	ดินสีดำปนทราย มีเศษรากไม้ปน	โคโลนีสีเหลืองเข้ม แข็ง
sam86	10^{-3}	สวนผัก นครปฐม	ดินสีดำร่วน มีเศษฟาง ใบไม้ปน	โคโลนีสีขาวแห้ง เป็นผง
sam87	10^{-4}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีเหลืองนวล ย่น
sam88	10^{-5}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีสส้มอ่อน
sam89	10^{-5}	โป่งน้ำพุร้อน กาญจนบุรี	ดินเหนียวสีดำ แฉะ	โคโลนีสีส้มแดง เป็นดอกใหญ่ แข็ง
sam90	10^{-4}	โป่งน้ำพุร้อน กาญจนบุรี	ดินเหนียวสีดำ แฉะ	โคโลนีสีม่วง เป็นดอกเล็ก แข็ง
sam91	10^{-5}	ทางเดินน้ำตกวชิรธาร เชียงใหม่	ดินสีน้ำตาล แข็ง	โคโลนีสีม่วงเข้มขอบเป็นวงสีขาวนูน
sam92	10^{-5}	ผาแต้ม อุบลราชธานี	ดินสีกะปิ แข็ง ชื้น	โคโลนีสีขาว นูนเป็นดอก
sam93	10^{-4}	ลำปีล็อก กาญจนบุรี	ดินสีดำ ร่วน ชื้น ปนทราย	โคโลนีสีส้ม เป็นดอกเล็ก สปอร์สีขาว
sam94	10^{-4}	ลำปีล็อก กาญจนบุรี	ดินสีดำ ร่วน ชื้น ปนทราย	โคโลนีสีโอวัลติน สปอร์สีขาว
sam95	10^{-4}	ลำปีล็อก กาญจนบุรี	ดินสีดำ ร่วน ชื้น ปนทราย	โคโลนีสีเทา สปอร์สีขาว
sam96	10^{-4}	ลำปีล็อก กาญจนบุรี	ดินสีดำ ร่วน ชื้น ปนทราย	โคโลนีสีเหลือง นูนตรงกลางสีขาว

หมายเหตุ เชื้อทุกตัวติดสีแกรมบวก (gram positive)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 บนอาหารแข็ง starch cacein agar

รูปที่ 2 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 บนอาหารแข็ง starch cacein agar

รูปที่ 3 โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 บนอาหารแข็ง starch cacein agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็ง

จากเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้งหมด 96 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินตัวอย่าง เมื่อนำมาคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด คือ *Aspergillus niger*, *Lasiodiplodia theobremae* และ *Peranophythora lichi* บนอาหาร starch casein agar + potato dextrose agar (ในอัตราส่วน1 ต่อ1) พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีต 77 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งใน 77 ไอโซเลทนี้ มีเพียง 10 ไอโซเลท เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชครบทั้ง 3 ชนิด โดยมีความสามารถในการยับยั้งไม่เท่ากัน ดังตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยดูจากความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Peranophythora lichi* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.05 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* และ*Lasiodiplodia theobremae* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.98 และ11.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้รองลงมา จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้ง 3 ไอโซเลท ไปศึกษาในขั้นตอนต่อๆ ไป เพื่อให้ได้เชื้อแอคติโนมัยซีตที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีต

รหัสเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Aspergillus niger	*Lasiodiplodia theobremae*	*Peranophythora lichi*
Sam1	1.25^{m}	-	-
Sam2	-	-	3.38^{g}
Sam3	-	-	2.45^{h}
Sam4	9.42^{c}	6.38^{defgh}	4.42^{e}
Sam5	-	-	-
Sam6	7.53^{de}	2.12^{r}	5.01^{d}
Sam7	10.21^{b}	10.17^{b}	8.05^{a}
Sam8	-	5.32^{ijkl}	-
Sam9	5.58^{f}	-	-
Sam10	9.34^{c}	6.36^{defgh}	4.67^{b}
Sam11	-	2.21^{r}	-
Sam12	-	-	-
Sam13	-	-	-
Sam14	7.42^{de}	6.28^{defgh}	4.53^{e}
Sam15	-	3.42^{opq}	-
Sam16	-	-	-
Sam17	-	-	-
Sam18	4.92^{fg}	5.68^{ghij}	2.05^{i}
Sam19	-	-	-
Sam20	3.58^{ij}	-	-
Sam21	-	-	-
Sam22	-	-	-
Sam23	-	-	-
Sam24	-	-	-
Sam25	-	-	-
Sam26	-	-	-
Sam27	-	2.67^{qr}	-
Sam28	-	-	-
Sam29	2.38^{l}	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Aspergillus niger	*Lasiodiplodia theobremae*	*Peranophythora lichi*
Sam30	-	-	-
Sam31	7.78^{de}	6.84^{de}	5.85^{c}
Sam32	-	-	-
Sam33	-	-	-
Sam34	2.23^{l}	-	-
Sam35	-	-	-
Sam36	-	3.74^{nop}	-
Sam37	-	3.98^{mno}	-
Sam38	3.42^{jk}	-	-
Sam39	7.02^{c}	-	-
Sam40	5.12^{fg}	6.28^{defgh}	-
Sam41	-	-	-
Sam42	-	-	-
Sam43	-	-	-
Sam44	-	5.87^{fghi}	-
Sam45	-	4.47^{mn}	-
Sam46	-	6.28^{defgh}	-
Sam47	3.47^{j}	-	-
Sam48	-	-	-
Sam49	-	-	-
Sam50	-	-	-
Sam51	-	-	-
Sam52	4.32^{gh}	-	3.74^{f}
Sam53	2.23^{l}	4.83^{jklm}	-
Sam54	-	-	-
Sam55	7.91^{d}	5.74^{ghi}	3.12^{g}
Sam56	-	-	-
Sam57	-	-	-
Sam58	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Aspergillus niger	*Lasiodiplodia theobremae*	*Peranophythora lichi*
Sam59	-	2.62^{qr}	-
Sam60	-	-	-
Sam61	-	3.98^{mno}	-
Sam62	-	-	-
Sam63	-	-	2.43^{h}
Sam64	-	-	1.76^{i}
Sam65	-	-	-
Sam66	4.38^{ghi}	-	-
Sam67	4.02^{hij}	-	-
Sam68	-	-	-
Sam69	-	5.87^{fghi}	-
Sam70	9.87^{bc}	7.96^{c}	7.02^{b}
Sam71	-	6.45^{defg}	-
Sam72	-	5.52^{hijk}	-
Sam73	-	-	-
Sam74	-	-	-
Sam75	-	4.75^{klm}	-
Sam76	-	-	-
Sam77	-	4.53^{lmn}	-
Sam78	-	6.67^{def}	-
Sam79	-	-	-
Sam80	-	-	-
Sam81	2.68^{kl}	-	-
Sam82	-	-	-
Sam83	-	-	-
Sam84	-	-	-
Sam85	-	-	-
Sam86	4.53^{gh}	-	3.12^{g}
Sam87	-	3.08^{pq}	1.81^{i}

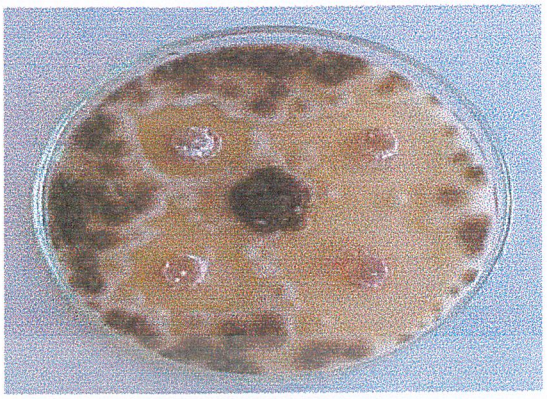
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

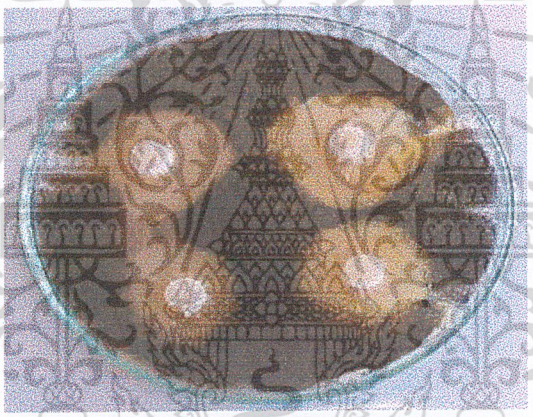
รหัสเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Aspergillus niger	*Lasiodiplodia theobremae*	*Peranophythora lichi*
Sam88	-	6.08^{efghi}	-
Sam89	-	-	-
Sam90	-	-	-
Sam91	-	-	-
Sam92	12.98^{a}	11.17^{a}	4.01^{c}
Sam93	-	5.58^{ghijk}	-
Sam94	-	5.58^{ghijk}	-
Sam95	-	-	-
Sam96	5.38^{f}	7.04^{d}	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีต ตัวเลขในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี DMRT

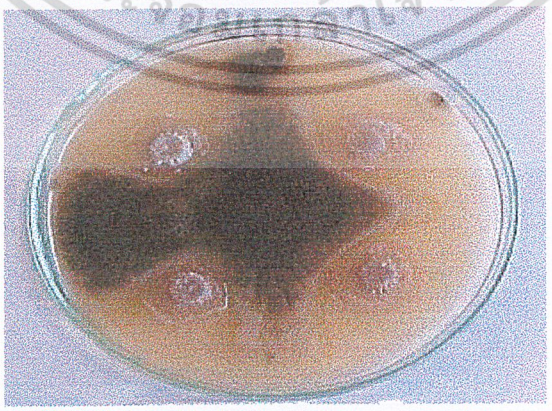
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 บนอาหาร starch cacein agar



รูปที่ 5 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 บนอาหาร starch cacein agar



รูปที่ 6 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobremae* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 บนอาหาร starch cacein agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีต

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้ง 10 ไอโซเลทที่ผ่านขั้นตอนของการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารแข็ง แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส (ภาคผนวก ข) ซึ่งการตรวจสอบในขั้นตอนนี้ใช้วิธีการวัดบริเวณใส(clear zone) ที่เกิดรอบบริเวณโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีต จากตารางที่ 4 เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อแอคติดนมัยซีตรหัส sam 10 สร้างเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด คือ 12 มิลลิเมตร รองลงมาคือ sam 92 และ sam7 ตามลำดับ ส่วน sam 31 sam 55 และ sam 70 สร้างเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกันทางสถิติ จึงทำการเลือกใช้ sam 10 sam 92 และ sam 7 ไปทำการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวต่อไป

ตารางที่ 4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต 10 ไอโซเลท

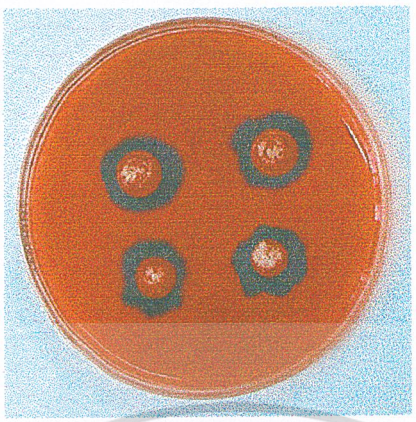
รหัสเชื้อ	บริเวณใส (มิลลิเมตร)
sam 4	-
sam 6	-
sam 7	8.75[c]
sam 10	12.00[a]
sam 14	3.15[e]
sam 18	-
sam 31	5.66[d]
sam 55	5.68[d]
sam 70	5.73[d]
sam 92	10.30[b]

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณใส (clear zone)รอบโคโลนีแอคติโนมัยซีต

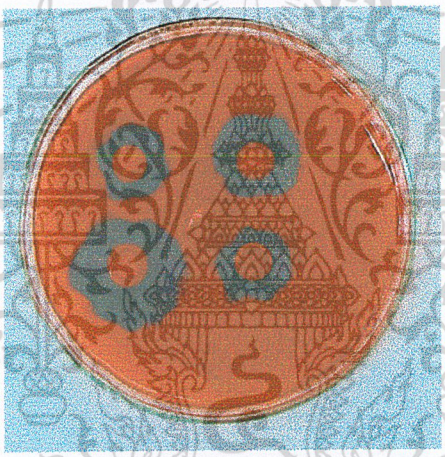
ตัวเลขในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี DMRT

เนื่องจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobremae* มีการเจริญเติบโตที่ช้ามาก ทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อน และยากต่อการวัดผล ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้เชื้อราทดสอบที่ทำให้เกิดโรคพืชเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ *Aspergillus niger* และ *Peranophythora lichi*

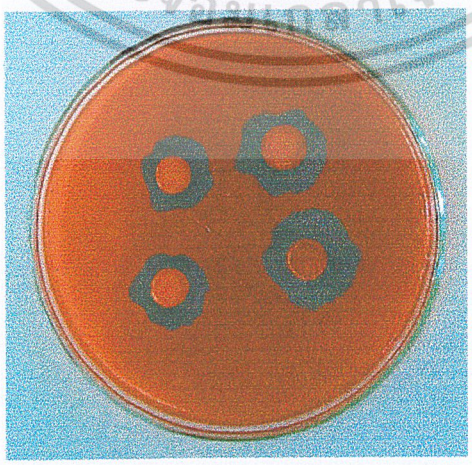
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7



รูปที่ 8 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10



รูปที่ 9 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92

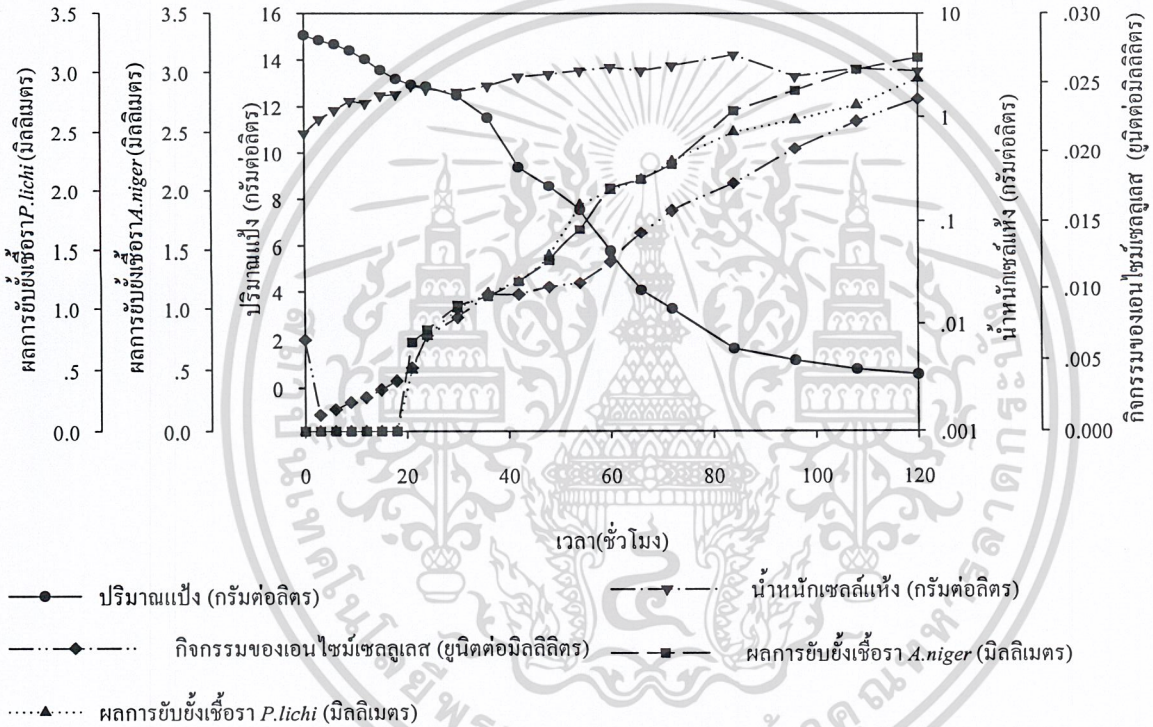
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

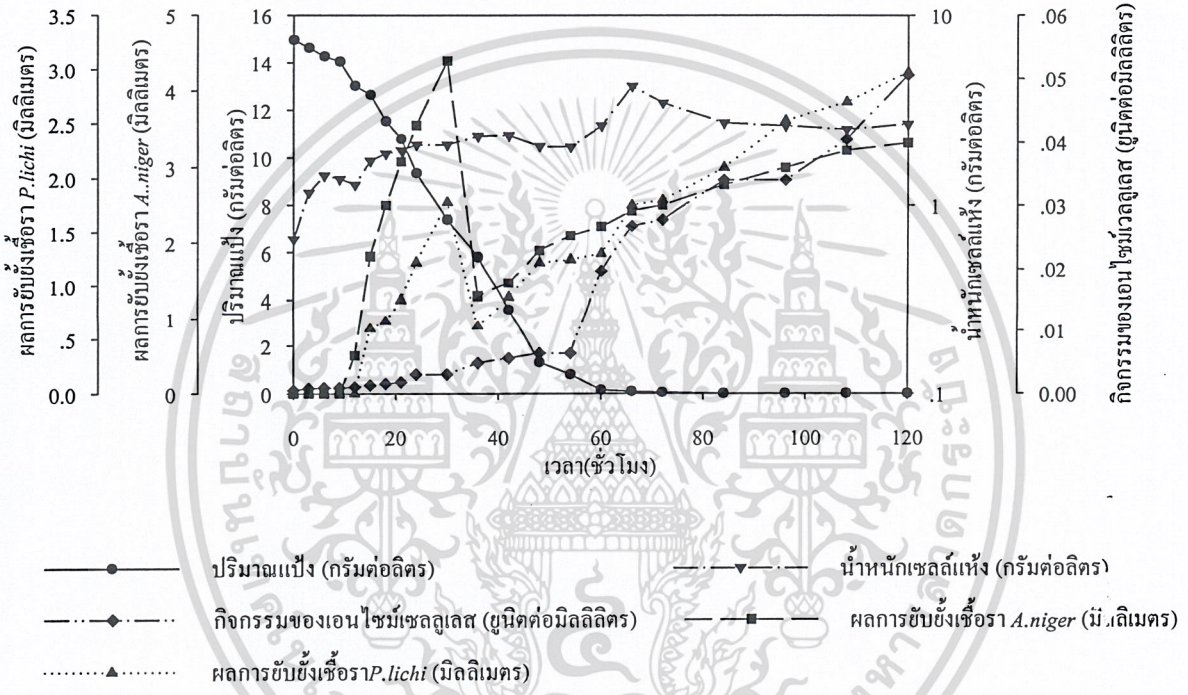
นำเชื้อแอคติโนมัยซีต จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อรหัส Sam 7 Sam 10 และSam 92 ที่คัดเลือกได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว starch casein ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxy methyl cellulose ;CM-cellulose) เพื่อชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ดี โดยมีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 4.4 มิลลิเมตร ในชั่วโมงที่ 40 ดังรูปที่ 11 สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi* ได้ดี โดยมีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 3.13 มิลลิเมตร ในชั่วโมงที่ 120 ดังรูปที่ 12 รวมทั้งมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงด้วย เท่ากับ 0.1477 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 จะให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 2.76 กรัมต่อลิตร และมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิด ได้ต่ำกว่าเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 และ sam 92

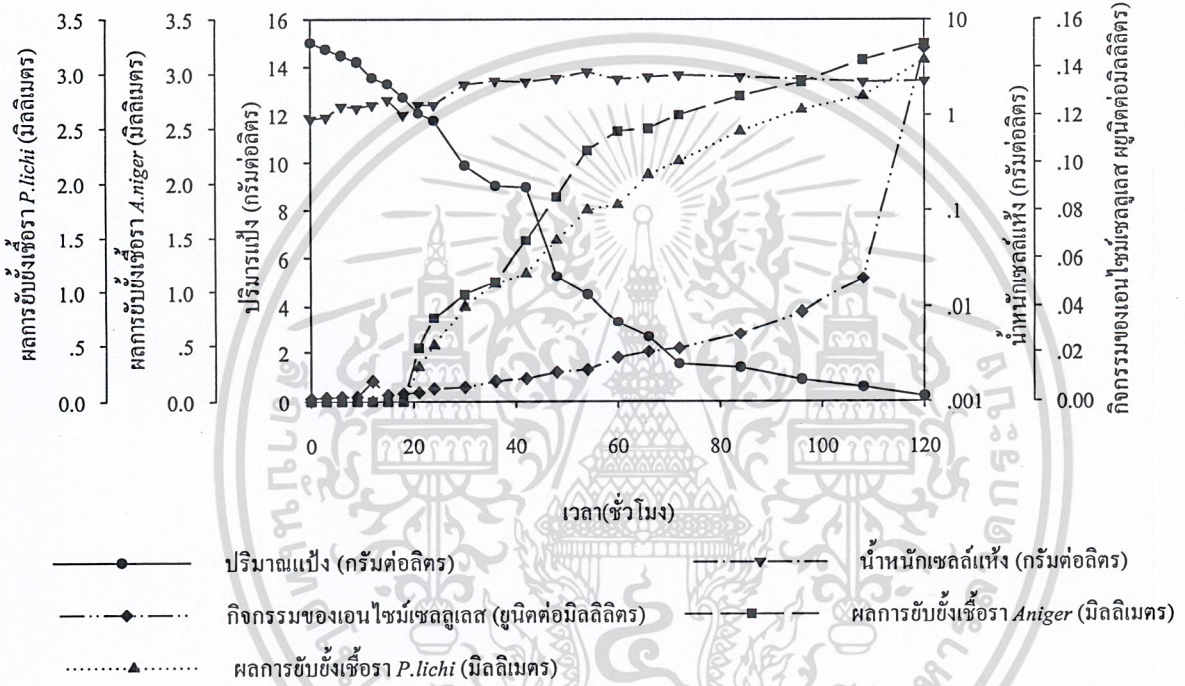
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 ในอาหารเหลว starch casine ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง 7.0



รูปที่ 11 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 ในอาหารเหลว starch casine ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง 7.0



รูปที่ 12 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 ในอาหารเหลว starch casine ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง 7.0

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตsam 7 sam 10 และ sam 92

รหัสเชื้อ	μ	$Y_{x/s}$	*A.niger*		*P.lichi*	
			q_p	Q_p	q_p	Q_p
sam 7	0.0773	0.1419	0.0177	0.0242	0.0199	0.0247
sam 10	0.0443	0.1338	0.0131	0.0262	0.113	0.0226
sam 92	0.0578	0.0927	0.0207	0.0283	0.0208	0.0285

หมายเหตุ μ อัตราจำเพาะของการเจริญเติบโต (ต่อชั่วโมง ,h^{-1})

q_p อัตราจำเพาะของการผลิตสารปฏิชีวนะ (มิลลิลิตรต่อกรัมเซลล์ชั่วโมง ,mm.g $cell^{-1}h^{-1}$)

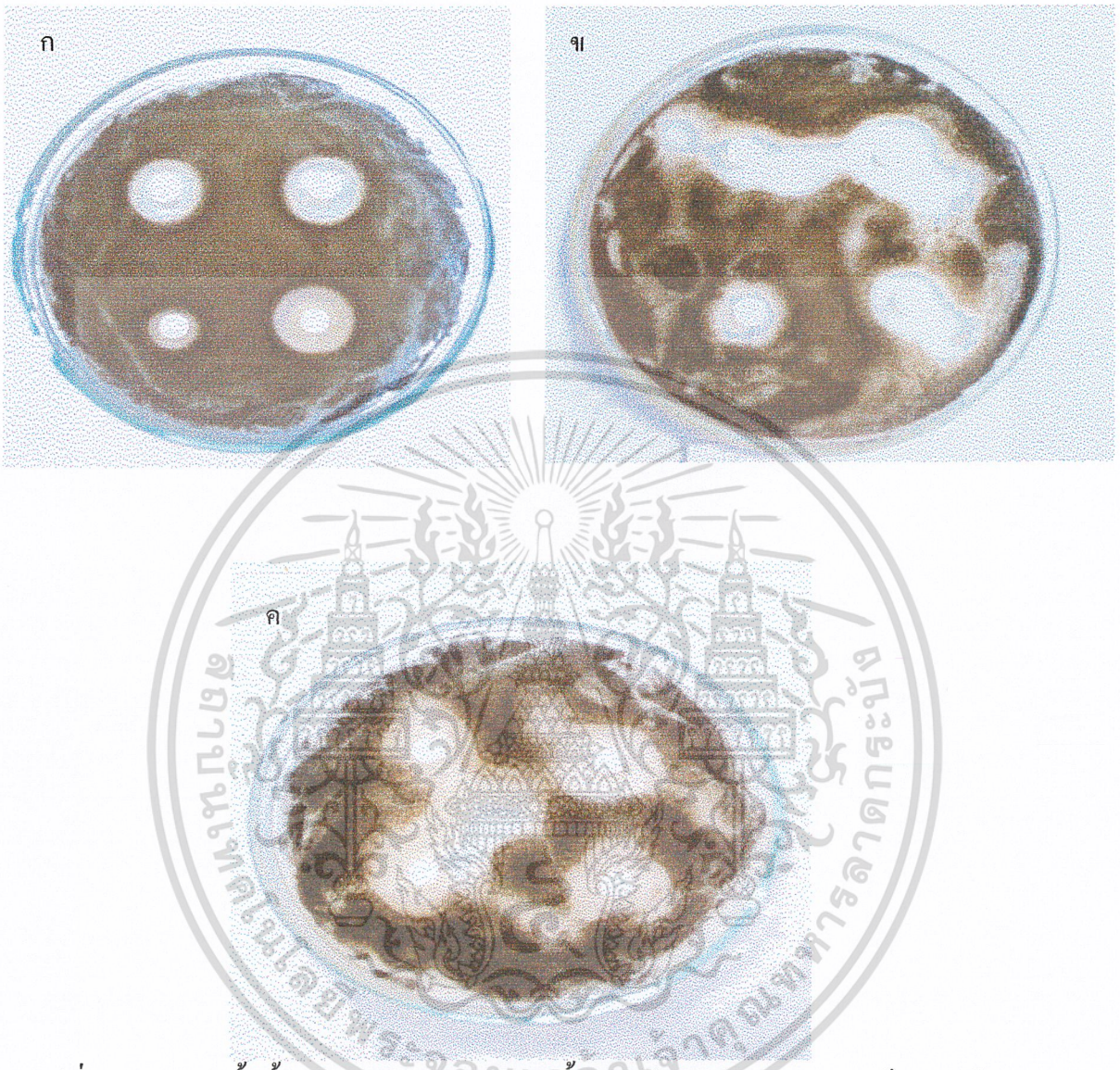
Q_p อัตราการผลิตสารปฏิชีวนะ (มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ,$mm.h^{-1}$)

$Y_{x/s}$ ผลได้ของเซลล์จากการใช้แป้งมันสำปะหลัง (กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง ,g cell.g $starch^{-1}$)

จากตารางพบว่าอัตราการผลิตสารปฏิชีวนะ (Q_p)เพื่อยับยั้งเชื้อรา *A.niger* และ *P.lichi* ของเชื้อแอคติโนมัยซีต sam 92 มีค่ามากที่สุด และเมื่อพิจารณาอัตราจำเพาะของการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่า sam 92 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด เช่นกัน

เมื่อมองในแง่ของผลได้ของเซลล์แอคติโนมัยซีตจากการใช้แป้งมันสำปะหลัง พบว่า sam 7 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์ได้ดีที่สุด คือเท่ากับ 0.1419 กรัมเซลล์ต่อกรัมแป้ง ส่วนอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ sam 7 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เท่ากับ 0.0773 ต่อชั่วโมง เช่นกัน

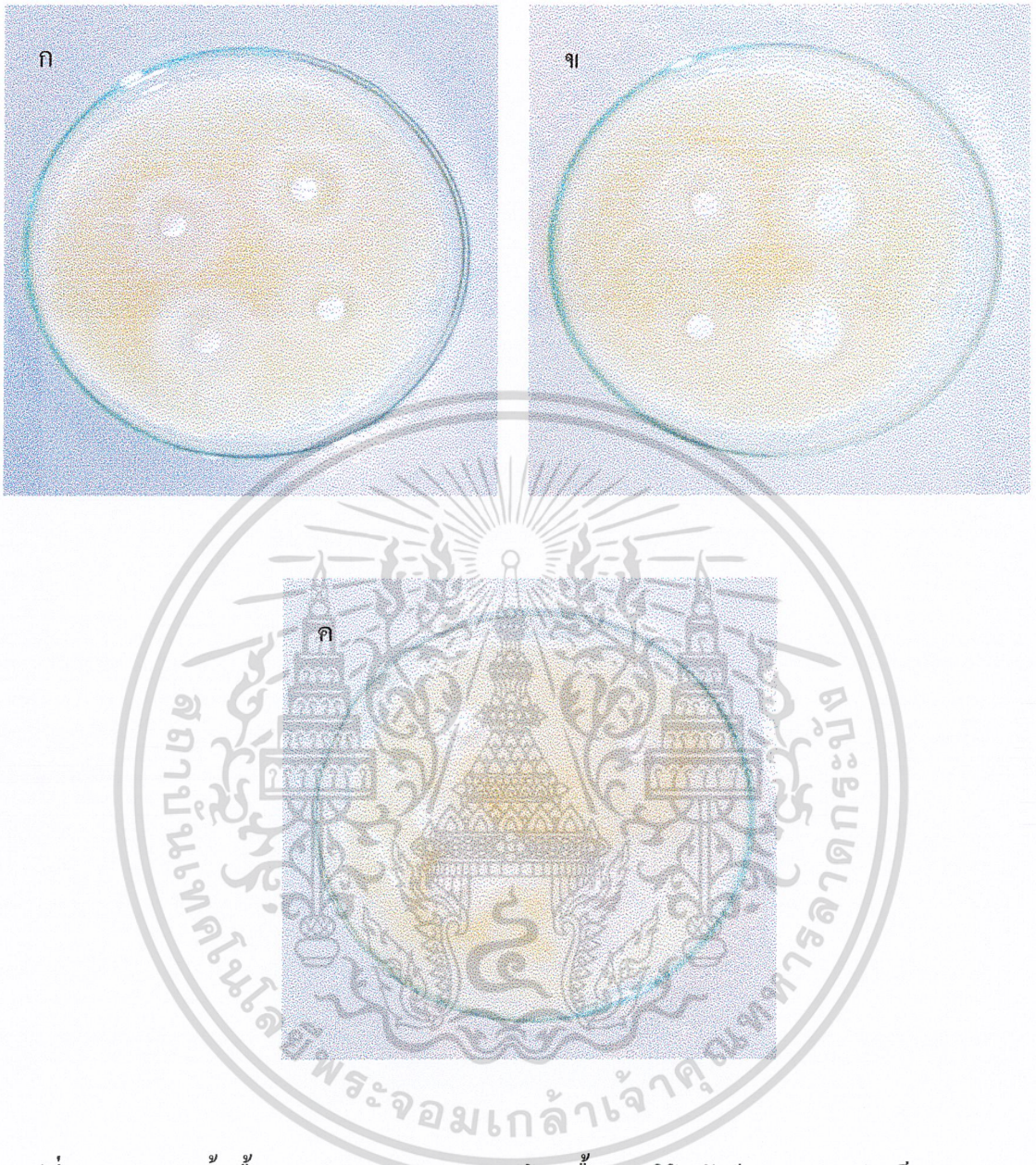
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต บนอาหารแข็ง PDA โดยวิธีการใช้เปเปอร์ดิสก์ (paper disc)

ก) รหัส sam 7 ข) รหัส sam 10 ค) รหัส sam 92

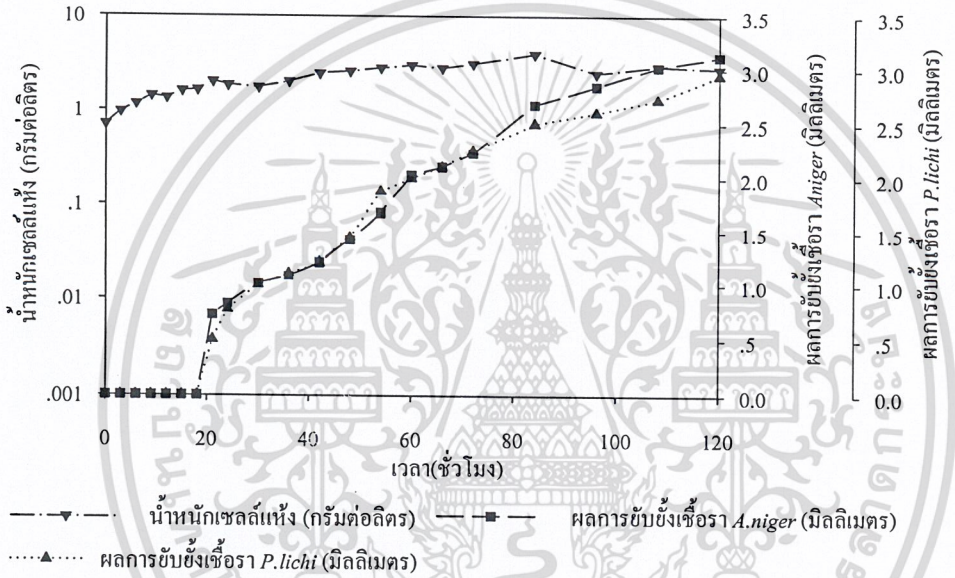
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



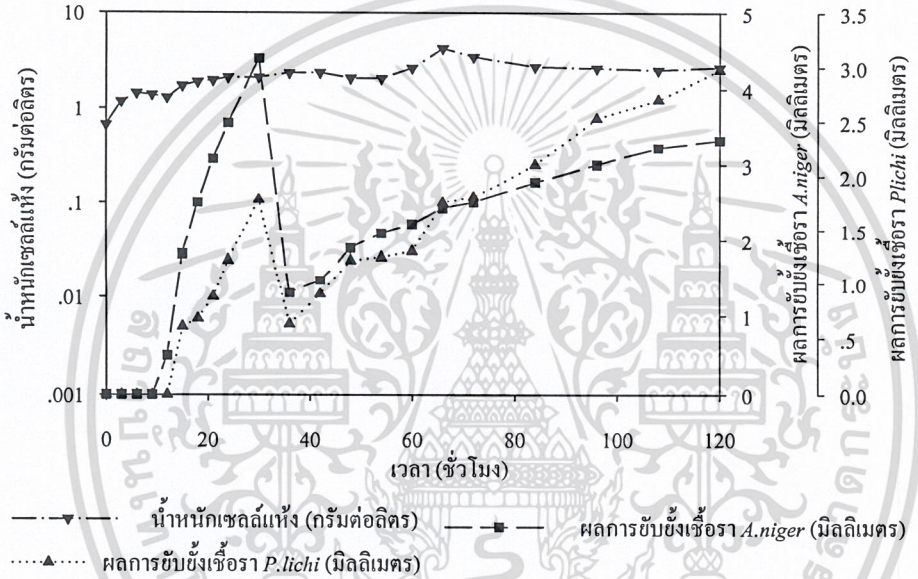
. **รูปที่ 15** ผลการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi* โดยเชื้อแอคติโนมัยซีต บนอาหารแข็ง PDA โดยวิธีการใช้เปเปอร์ดิสก์ (paper disc)

ก) รหัส sam 7 ข) รหัส sam 10 ค) รหัส sam 92

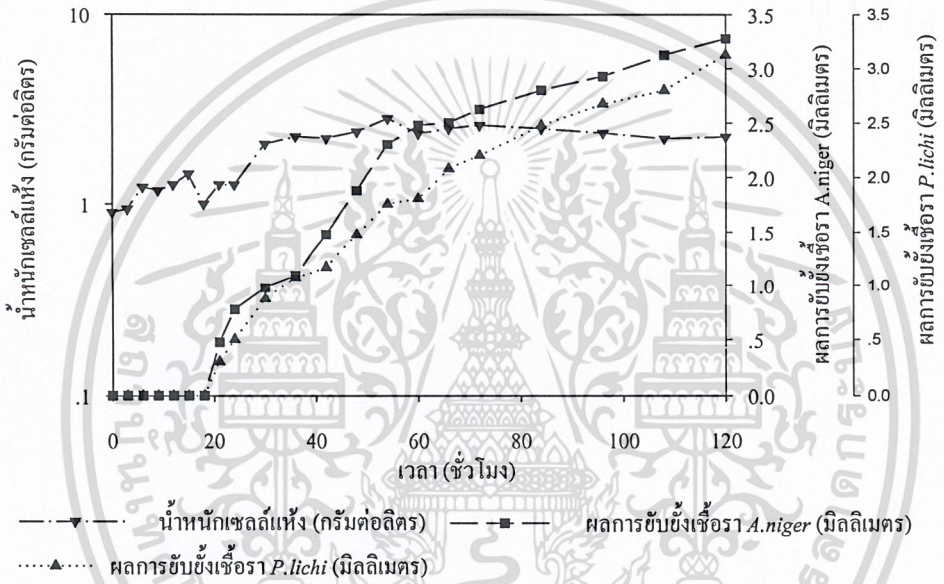
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *A.niger* และ *P.lichi*



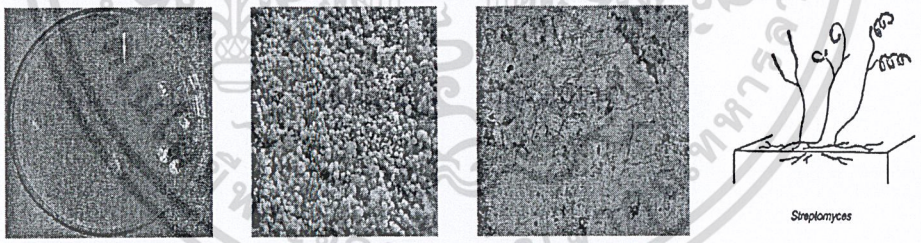
รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *A.niger* และ *P.lichi*



รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *A.niger* และ *P.lichi*

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 sam10 และ sam 92 กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา *A.niger* และ*P.lichi* พบว่าเริ่มเชื้อทั้ง 3 รหัส สร้างสารปฏิชีวนะขึ้นในระยะเอกซ์โพเนนเชียล ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 sam 10 และ sam92 ที่สร้างเพิ่มขึ้นในระยะการเจริญเติบโตเริ่มคงที่ (stationary phase)นั้นเป็นสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาเชื้อทั้ง 3 รหัส คือ sam 7 sam 10 และ sam 92 พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินสวนส้ม ที่มีลักษณะเป็นดินเหนียว แฉะ จากจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวอมชมพูรูปร่างคล้ายดอกไม้ ผิวของโคโลนีย่น แข็ง คล้ายหนังสัตว์ แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวจะให้ตัวเซลล์เป็นสีส้มเหลือง และสามารถปล่อยสีที่สร้างขึ้นแพร่ออกมาในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย โดยสีที่ได้จะเข้มขึ้นตามเวลาที่มากขึ้นในการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมและตรวจดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเชื้อมีรูปร่างแตกเป็นกิ่งก้านคล้ายกิ่งไม้ และติดสีแกรมบวก เมื่อนำสไลด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับภาพเชื้อแอคติโนมัยซีตจากหนังสือจัดหมวดหมู่แบคทีเรีย Bergy's manual of Bacteriology พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตในรหัส SAM 7 น่าจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสเตรปโตมัยซีต



ก ข ค ง

รูปที่ 19 ลักษณะต่างๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 7

ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง

ข) ลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว

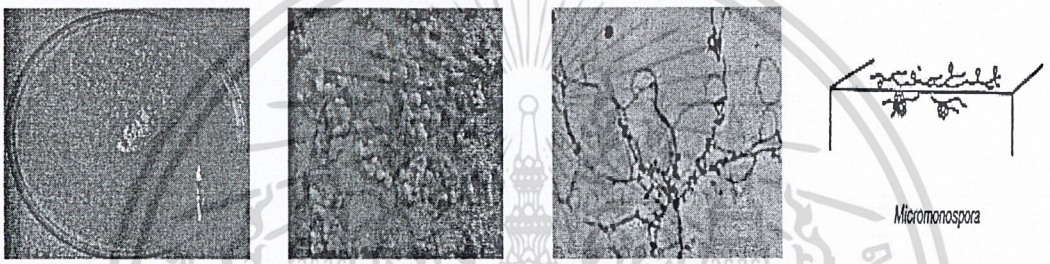
ค) ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการติดสีแกรม

ง) ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มสเตรปโตมัยซีต จากหนังสือ Bergy's manual of Bacteriology

สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินดำ แห้งป่น มีเศษรากพืชปนอยู่ด้วย ซึ่งเก็บได้จากกิ่วแม่ปาน ดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ผิวหน้าย่น ยืดหยุ่น และมีสปอร์สีขาว แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวจะให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวเซลล์เป็นสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน และสามารถปล่อยสีที่สร้างขึ้นแพร่ออกมาในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย โดยสีที่ได้จะเข้มขึ้นตามเวลาที่มากขึ้นในการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมและตรวจดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเชื้อมีรูปร่างเป็นสายโซ่สาย และมีบางส่วนเจาะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และติดสีแกรมบวก เมื่อนำสไลด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับภาพเชื้อแอคติโนมัยซีตจากหนังสือจัดหมวดหมู่แบคทีเรีย Bergy's manual of Bacteriology พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตในรหัส sam 10 น่าจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของไมโครโมโนสปอรา

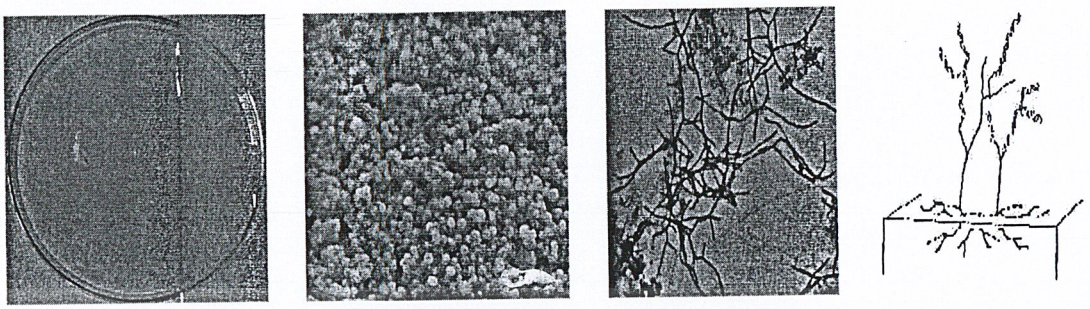


ก ข ค ง

รูปที่ 20 ลักษณะต่างๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10
ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง
ข) ลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว
ค) ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการติดสีแกรม
ง) ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มไมโครโมโนสปอรา จากหนังสือ Bergy's manual of Bacteriology

เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินผาแต้ม ที่มีลักษณะเป็นดินสีกะปิ แข็ง ชื้น จากจังหวัดอุบลราชธานี เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว แข็ง นูน และมีสปอร์สีขาว แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวจะให้ตัวเซลล์เป็นสีชมพูแดง และสามารถปล่อยสีที่สร้างขึ้นแพร่ออกมาในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย โดยสีที่ได้จะเข้มขึ้นตามเวลาที่มากขึ้นในการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมและตรวจดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าเชื้อมีรูปร่างเป็นโซ่ยาว แตกเป็นกิ่งก้าน คล้ายกิ่งไม้ และติดสีแกรมบวก เมื่อนำสไลด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับภาพเชื้อแอคติโนมัยซีตจากหนังสือจัดหมวดหมู่แบคทีเรีย Bergy's manual of Bacteriology พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตในรหัส sam 92 น่าจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของนอคาร์เดีย (Nocardiopsis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข ค ง

รูปที่ 21 ลักษณะต่างๆ ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92

ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง

ข) ลักษณะของเชื้อเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลว

ค) ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการติดสีแกรม

ง) ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มนอคาร์เดีย จากหนังสือ Bergy's manual of Bacteriology

จากการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่คัดแยกได้ ทำให้สามารถอธิบายความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่แตกต่างกันได้ โดยเชื้อในกลุ่มสเตรปโตมัยซีตมักจะผลิตสารปฏิชีวนะพวก Polyenes ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ แต่มักจะไม่มีผลต่อแบคทีเรีย โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นจะไปจับกับสเตรอลที่อยู่บนเซลล์เมมเบรนของเชื้อรา มีผลทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

เชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มไมโครโมโนสปอราจะผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มมาโครไลด์ (macrolides) ที่มีสูตรโครงสร้างเป็น macrocyclic lactone ring เชื่อมกับน้ำตาล โดยมีประสิทธิภาพสูงกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบทรงกลมบางชนิด ซึ่งสารปฏิชีวนะนี้จะไปยับยั้งการเจริญโดยรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อ และจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นในสภาวะที่เป็นด่าง (พีเอชประมาณ 8.5)

เชื้อแอคติโนมัยซีตในกลุ่มนอคาร์เดีย (Nocardiopsis) จะผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนกลัยโคซายด์ (aminoglycosides) ซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดไปและกลับสู่สภาพเดิมไม่ได้ ผลก็คือจุลินทรีย์จะตายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตในตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆของประเทศไทย 19 แหล่ง ด้วยอาหาร starch-casine agar ที่ดัดแปลงจาก Kuster และ Willium สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 96 ไอโซเลท และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตจำนวน 77 ไอโซเลทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช *A.niger* หรือ *P.lichi* หรือ *L. theobremae* ได้ แต่พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีตเพียง 10 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด จึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้ง 10 ไอโซเลทไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด โดยดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นคือมีค่าเท่ากับ 12 มิลลิเมตร รองลงมาคือ sam 92 และ sam 7 ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้ง 3 ชนิดไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 สามารถยับยั้งเชื้อรา *A.niger* ได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 92 สามารถยับยั้งเชื้อรา *P.lichi* ได้ดีที่สุด รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสได้สูงสุดด้วย

เชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า สามารถผลิตสารชนิดหนึ่งได้ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A.niger* ได้สูงที่สุด (บริเวณยับยั้ง เท่ากับ 4.4 มิลลิเมตร) ซึ่งสารชนิดนี้อาจไม่ใช่สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น รวมทั้งไม่น่าจะใช่เอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อสร้างด้วย อาจเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวอาจจะเป็นสารสีที่เซลล์สร้างขึ้น เพราะเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 ในอาหารเหลวพบว่าสีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเข้มขึ้นตามเวลา คล้ายกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Monascus* sp. เพื่อผลิตสีนั้น พบว่าสารสีที่เชื้อสร้างขึ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วย(www.biogen.com) แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษา และค้นคว้าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาถึงความคงตัว ความบริสุทธิ์ และโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 และ sam 92 ต่อไป รวมทั้งศึกษาการยับยั้งเชื้อรา A.niger ของเชื้อรหัส sam 10 ต่อไปด้วย

2. ควรมีการศึกษาถึงพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam 10 และ sam 92 โดยอาจใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมสร้างเซลล์ลูกผสมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงอีกด้วย

3. ควรมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ (by product) ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีตในอาหารเหลว เช่น สารสี เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ได้จากจากย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นสับสเตรท) รวมถึงวิตามินบี 12 ที่เชื้อแอคติโนมัยซีตสามารถผลิตได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา ปรีชานุกูล. 2533. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองจากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เกษม สร้อยทอง. 2532ก. การใช้เชื้อรา *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช. 9(1) : 28-33.

เกษม สร้อยทอง. 2534. การใช้เชื้อรา *Chaetomium globosum* ควบคุมโรคใบจุดของข้าวโพด. หน้า 269-275. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 29. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกษม สร้อยทอง และชลฎา สถิตวัฒโนทัย. 2536. การควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Phythium ultimum* Trow โดยชีววิธี. หน้า 45. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

จริยา จันทร์ไพแสง. 2538. ความหลากหลายของพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*ที่พบในประเทศไทย. หน้า 141-150. ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538ก. จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชในรูปชีวภัณฑ์ : ผลิตภัณฑ์ที่ต้องพิจารณา ตอนที่ 1. วารสารเคหการเกษตร. 19(4) : 141-148.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538ง. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา : ตอนที่ 1 หลักการและบทบาท. วารสารเคหการเกษตร. 19(8) : 141-145.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538จ. การผลิตและการประยุกต์ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช. หน้า 151-169. ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ต้องได้รับอนุญาตจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ. 2536. ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) พันธุ์กลายที่ต้านทานเบนโนมิลในการควบคุมโรคโคนต้นเน่าของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อราสเคลอโรเทียม (*Sclerotium rolfsii*). หน้า 34. ใน การประชุมวิชาการครั้งที่ 11 เรื่องเทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. นครปฐม : ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง และบรรเจิด อินหว่าง. 2529. การควบคุมโรคเน่าระดับดินไรซ๊อกโทเนียของฝ้ายโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยจุลินทรีย์. วารสารโรคพืช. 6(3-4) : 63-72.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล เกษนรา. 2534. การผลิตและทดสอบคุณภาพของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 25 : 169-176.

ช่อทิพย์ ถนอมถิ่น. 2538. การใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าละในมันฝรั่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดารารัตน์ รอดพยาธิ์. 2525. สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. cu 279 จากดินประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. ใน ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

บรรเจิด อินหว่าง และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2529. การควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ (*Rhizoctonia solani* Kuehn) โดยจุลินทรีย์จากดินเกษตรกรรม. หน้า 173-185. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 24 สาขาพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2521. จุลชีววิทยาทั่วไป. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน. ชลบุรี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญา จันทร์ศรี และคณะ. 2533. การควบคุมโรคเน่าเละของมันฝรั่งโดยชีววิธี. หน้า 467-476. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 28. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณจันทร์ เมฆธน และชัยวัฒน์ กระตุฤกษ์. 2537. การป้องกันกำจัดโรครากเน่าของทุเรียนโดยชีววิธีด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AP01 (ลาร์มิน่า®). หน้า 200-208. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มานะ กาญจนมณีเสถียร และคณะ. 2536. ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อราแอนทาโกนิสต์ และเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว. หน้า 611-613. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 31. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วชิร ใจภักดี. 2544. การคัดแยกแอคติโนมัยซีตที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินในประเทศไทยและตรวจสอบลำดับเบสของ 16S rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรี สมสุข. 2538. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 207-221. ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

วัชรี สมสุข และพิมลพร นันทะ. 2535. การผลิตไส้เดือนฝอยปราบแมลงศัตรูพืชด้วยอาหารเทียม. วารสารวิชาการเกษตร กษ. 10(1) : 1-4.

วารุณี ประดิษฐศรีกุล. 2526. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมฤทธิ์ เกียววงษ์ และคณะ. 2542. การประเมินศักยภาพการควบคุมผักตบชวาโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Aphanomyces* sp. . หน้า 141-148. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 37. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศษสตร์.

สายสนม เอนกผลิน. 2535. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุธามาศ อินตะสอน และคณะ. 2537. ประสิทธิภาพของส่วนผสมผงเชื้อราไตรโคเดอร์มา เมื่อใช้ร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อราต่อโรคเน่าของต้นกล้าส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อราไฟทอฟทอรา พาราซิติกา. หน้า 144-161. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภกิจ กิจภิญโญ. 2536. การประเมินความเสียหย การเปลี่ยนแปลงประชากร และการป้องกันกำจัดเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ในแปลงทดสอบโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร อวรัญ และคณะ. 2537. การใช้ส่วนผสมของผงเชื้อราไตรโคเดอร์มาร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อราในการควบคุมโรคเน่าของกล้าทุเรียน ซึ่งเกิดจากเชื้อราไฟทอฟทอรา พัลมิวอรา. หน้า 162-179. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวิชาน มนแพวงศานนท์. 2545. การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS for Windows ทุกเวอร์ชัน. น. 169-173.

องอาจ เติมเกียรติไพศาล และคณะ. 2534. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ดิน เพื่อควบคุมโรครากเน่าไฟทอฟทอรา ของส้มเขียวหวานโดยชีววิธี. หน้า 319-330. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 29. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา ตันติโชดก. 2538. การผลิตและการนำ *Bacillus thuringiensis* ไปใช้ในสภาพไร่. หน้า 200-202. ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2538. การผลิตและนำไวรัส นิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีส ไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 203-206. ใน สมคิด ดิสถาพร (ผู้รวบรวม). เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมวิชาการเกษตร.

อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์ และคณะ. 2535. ผลของแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. หน้า 321-328. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช ครั้งที่ 30. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotics biosynthesis. Ann. Rev. Micro. 34 : 209-233.

Aharonowitz, Y. and A.L. Demain. 1979. Nitrogen Nutrition and Regulation of Cephalosporin Production in *Streptomyces olavuligerus*. Can. J. Microbiol. 25 : 61-67.

Alexander Martin. 1999. Microbial Ecology. Introduction to soil microbiology second edition. 36-50.

Arndt, C. , M.C. Cruz, M.E. Cardenas and J. Heitman. 1999. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 145 : 1989-2000.

Aszalos, A. 1986. Modern analysis of antybiotics. Marcel Dekker, Inc., New York. 322 p.

Ball S. , C.J. Bessell and A. Mortimer. 1957. The production of polyene antibiotics by soil Streptomycestes. J. Gen. Microbiol. 17 : 96-103.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barbacid, M. and D. Vasquez. 1974. H^3 – anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. J. Mol. Biol. 84 : 603-623.

Bormann, C., D. Baier, H. Ingmar, C. Raps, J. Berger, G. Jung and H. Schwarz. 1999. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* T901 that interferes with growth polarity. J. of Bacteriol. 181 : 7421-7429.

Brookes, R. 1969. Dissolves oxygen control. Process. Biochem. 4 : 27-32.

Buchanan, R.E. and N.E. Gbbons. 1974. Order Actinomycetales, pp. 675-881. *In* S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A. W. Ravin and R.Y. Stanier. (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.

Bu'Lock, J.D. , D. Hamilton, M.A. Hulme, A.J. Powell, H.M. Smalley, D. Shepherd and G.N. Smith. 1975. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium uretieae*. Can. J. Microbiol. 11 : 765-778.

Bu'Lock, J.D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microl. 3 : 242-293.

Cella, R. and L.C. Vining. 1975. Resistance of Streptomycin a producing stain of *Streptomyces griseus*. Can. J. Microbiol. 21 : 463-471.

Cho, H. , J. Jose, L. Adrio, J. Saul, M. Luengo, S. Wolfe, S. Ocran, G. Hintermann, J.M. Piret and A.L. Demain. 1998. Elucidation of conditions allowing conversion of penicillin G and other penicillins to deacetoxycephalosporins by resting cells and extracts of *Streptomyces Clavuligerus* NP1. Appl. Biological Sci. 95 : 11544-11548.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coyne S. Mark. 1999. Filamentous Prokaryotes-Actinomyces. Soil Microbiology 101-108

Labeda P. David. 1990. Isolation of Actinomycetes for Biotechnological Applications. Isolation of biotechnological organism from nature. 1-15.

Crook, P. , C.C. Carpenter and P.F. Klens. 1950. The use of sodium propionate in isolating Actinomycetes from soils. Science 10 : 655-656.

Cross, T. and M. Goodfellow. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes, pp. 254-261. *In* G. Sykes and F.A. Skiner. Actinomycetes : Characteristics and Practical Importance. Academic Press, London.

Czoch, W.P. 1988. Actinomycetes enzyme. pp. 219-283. *In* Goodfellow, M. , S.T. Williams and M. Mordarski. (eds.). Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London.

Davis, G.H.G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. J. Gen. Microbiol. 21 : 612-621.

Demain, A.L. and J. Pirct. 1979. Relationship between antibiotics biosynthesis and sporulation, pp. 183-188. *In* M. Lackner and K. Schreiber (eds.). Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism. Pergamon Press, New York.

Donadio, S. , J. Staver, J.B. Moalpine, S.J. Swanson and L. Katz. 1991. Modular organization of gene required for complex polyketide biosynthesis. Science. 252 : 675-679.

Ehrilich, J. Q.R. Smith and D.A. Joslyn. 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil Actinomycetes. Science. 106 : 417.

El-Nakeeb, M.A. and H.A. Lechavalier. 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 11 : 75-77.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Funa, N. , Y. Ohinishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka and S. Horinouchi. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. Nature. 400 : 987-989.

Gaden, E.L. , Jr. 1960. Microbiological process discussion Bioengineering and Fermentation. Appl. Microbiol. 8 : 123-131.

Goodfellow, M. and A.G. O'Donnell. 1993. Handbook of new bacterial systemetics. Academic Press Limited, London. 560 p.

Goodfellow, M. 1989. Genus *Rhodococcus*, pp. 2648-2661. *In* S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Goodfellow, M. , S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. Actinomyces in biotechnology. Academic Press Limited, London. 501 p.

Gottieb, D. Antibiotics in Sykes, G. and Skiner, F.A. 1973. Actinomycetales characteristics and Practical Importance. New York : Academic press.

Gottieb, D. 1976. The production and role of Antibiotic in soil. J. of Antibiotic. 29 : 987-1000.

Gottieb, D. 1948. Some properties of an antibiotic obtained from a species of Streptomyces. J. Bacteriol. 55 : 409-417.

Haavik, H.I. 1974a. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : Effect of glucose. J. Gen. Microbiol. 81 : 383-390.

Haavik, H.I. 1974b. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : Role of catabolite repression and organic acids. J. Gen. Microbiol. 84 : 321-326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Halvorson, H.O. , R. Hansen and Campbell (eds.). 1972. Sporulation antibiotic of *Bacillus* spp. , Spore V. Am. Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 370 p.

Hamilton-Miller, J.M.I. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bacteriol. Rev. 37(2) : 166-196.

Hopwood, D.A. and D.H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketides and its composition To fatty acid biosynthesis. Ann. Rev. Genet. 24 : 37-66.

Isono, K. ; K. Asahi ; and S. Suzuki. 1969. Studies of polymycins, antifungal antibiotic XIII. The structure of polymyxins J. Am. Chem. Soc. 91 : 7490-7505.

Iwai, Y. ; J. Awaya; T. Kesado; H. Yamada; S. Omura; and I. Hata. 1973. Selective production Of cerulenin by *Cephalosporium caerelens* KF-140. J. Ferment. Technol. 51 : 575-581.

Iwai, Y. and S. Omura. 1982. Culture condition for screening of new antibiotics. J. Antibiotics. 35 : 123-141.

Kanoksilpatham, W. 1981. Studies on antibiotic production by *Streptomyces* and especially a *Streptoverticillium* species. Bangkok : A thesis for Master Degree of Science (Microbiology), Mahidol University.

Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The Peptide Antibiotics of *Bacillus* Chemistry, Biosynthesis And Possible Function. Bacteriol. Rev. 41 : 449-474.

Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*, pp. 2442-2450. *In* S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kelner, A. 1948. A method for investigating large microbial populations for antibiotic activity. J. Bacteriol. 56 : 157-162.

Kolomiets, E.I. , N.A. Zdor, T.V. Romanovskaya and A.G. Lobanok. 1996. Certain aspects of The phytoprotective activity of *S. flavescens*, an antagonist of phytopathogenic fungi. App. Biochem. and Microbiol. 64 : 714-720.

Kondo, H; H. Sumomogi; T. Otani; and S. Nakamura. 1979. Neoenactin, A New antifungal Antibiotic potentialing polyene antifungal antibiotics I, Fermentation, Extraction; Purification and Physico-chemical and Biological properties. J. Antibiotics. 31 : 13-17.

Kuhnt, M. , F. Bitsch, M. Ponelle, J. Sanglier, Y. Wang and B. Wolff. 1998. Microbial Conversion products of Leptomycin B. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 714-720.

Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature 30 : 928-929.

Labeda, D.P. and M.C. Shearer. 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological application, pp. 1-19. *In* D.P. Labeda. (ed.). Isolation of biotechnological organism from nature. McGraw-Hill, USA.

Lawrence, C.H. 1956. A method of isolating actinomycetes from scabby potato tissue and Soil with minimal contamination. Can. J. Bot. 34 : 44-47.

Lechavalier, H.A. and C.T. Corke. 1953. The replica plate method for screening antibiotic-Producing organisms. Appl. Microbiol. 1 : 110-112.

Lederberg, J. and E.M. Lederberg. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial Mutants. J. Bacteriol. 63 : 339-406.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Liu, C.M. ; L.E. McDaniel ; and C.P. Schaffner. 1975. Factors affecting the production of Candicidin. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 196-202.

Mahin, E.G. and R.H. Carr. 1923. Quantitative Agricultural Analysis. McGraw-Hill Book Company Inc. , New York. 329 p.

Malik, V.S. and L.C. Vining. 1970. Metabolism of chloramphenicol by the pròducing organism. Can. J. Microbiol. 16 : 175-179.

Martin, J.F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate Adv. Biochem. Eng. 6 : 105-127.

Martin, J.F. and A.L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Reviews. 44 : 230-251.

Mikami, Y. and J. Uno. 1988. *In vitro* and *in vivo* evaluation methods for antifungal agents. Life Sci. and Biotechnology. 4 : 44-49.

Nelson, N. 1944. A photometer adaptation of the Somogyi method for the determination Of glucose. J. Biol. Chem. 153 : 375-380.

Nonomura, H. and Y. Ohara. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method Effective for both preferential isolation and enumeration of Microbiospora and Streptosporangium strains in soil. J. Ferment. Technol. 47 : 463-469.

Norman, A.W. , R.A. Demel, B. Dekruyff and L.L.M. Van Deenen. 1972. Studies on the Biological properties of polyene antibiotics. J. Biol. Chem. 247 : 1918-1927.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 36-58. *In* M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski. (eds.). Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London.

Ottow, J.C. 1972. Rose bengal as selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from Natural sources. Mycologia. 604 : 304-315.

Parenti, F. and C. Coronelli. 1979. Members of the genus Actinoplanes and their antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 33 : 389-411.

Paulus, H. 1967. Polymyxins, pp. 254-267. *In* D. Gottlieb and P.D. Shaw (eds.). Antibiotic Vol. II. Springer-Verlag, Inc. , New York.

Pelczar, M. and R.D. Reid. 1965. Microbiology. New York : McGraw-Hill Book Company.

Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv. Appl. Microbiol. 14 : 73-92.

Rehacek, Z. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic producing actinomycetes. Adv Appl. Microbiol. 14 : 73-92.

Schlegel G. Hans. 1997. The system of Prokaryotes. General microbiology sixth edition 92-419.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16 : 313-340.

Shimi, I.R. ; A. Dewedar; and N. Abdallah. 1971. Yemenimycin A new antibiotic. J. Antibiotics. 24 : 283-289.

Simpson, T.J. 1991. The biosynthesis of polyketide. Natural Product Rep. 8 : 573-612.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, J. and J. L. Faull. 1988. Antagonism and biological control. 167-177. In K.G. Mukerji And K.L. Garg (editor). Biocontrol of Plant Diseases. Volume II. Florida : CRC Press.

Somogyi, M. 1952. Nete on sugar determination. J. Biol. Chem. 195 : 19-23.

Stansly, P.G. 1947. A bacterial spray apparatus useful in searching for antibiotic producing Microorganisms. J. Bacteriol. 54 : 443-445.

Stater, E.C. 1973. The mechanisms of action of the respiratory inhibitor actinomycin Biochem. Biophys Acta. 301 : 129-154.

Sukjaimit., S. and S. Sonthirat. 1988. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne Incognita* Chitwood) by a soil fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. Thai Phytopath. 8(2) : 84-90.

Tanaka, Y. 1992. Antifungal agents, pp. 30-44. *In* S. Omura (ed.). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer-Verlag, USA.

Tuffile, C.M. and F. Pinho. 1970. Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycetes fermentation. Biotechnol. Bioeng. 12 : 849-871.

Uchida, K; T. Ichikawa; Y. Shimauchi; T. Ishikura; and A. Ozaki. 1971. Hikizimycin A new Antibiotic. J. Antibiotics. 24 : 259-263.

Vanek, Z. , L. Dolezilova and Z. Rehacek. 1958. Formation of a mixture of antibiotic substances Including antibiotics of a polyene character by strains of actinomycetes freshly isolated from soil samples. J. Gen. Microbiol. 18 : 649-657.

Vining, L.C. 1979. Antibiotic tolerance in producer organisms. Adv. Appl. Microbiol. 25 : 147-148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Waksman, S.A. 1959. The Actinomycetes Vol. I : Nature, Occurrence and Activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 327 p.

Waksman, S.A. 1961. The role of Antibiotics in Nature. Perspet. Biol. Med. 4 : 271-278.

Waksman, S.A. and Henrici. 1974. Streptomycetaceae, pp. 747-753. *In* R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. , The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Waiker, J.B. 1974. Biosynthesis of the monoguanidinated inosital moiety of bluensomycin a Possible evolutionary precursor of Streptomycin. J. Biol. Chem. 249 : 2397-2404.

Weinberg, E.D. 1962. Trace-metal control of specific biosynthetic process. Perspect. Biol. Med. 5 : 432-445.

Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites : Role of trace metals. Adv. Microbiol. Physiol. 4 : 1-44.

Weinberg, E.D. 1973. Secondary metabolism : Control by temperature and inorganic phosphate. Dev. Ind. Microbiol. 15 : 70-81.

Weinstein, M.J. , G.M. Luedemann, E.M. Oden and G.H. Wagman. 1964. Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. Antimicrob. Agents Chemother. 1963 : 1-7.

Williams, S.T. , M. Goodfellow and G. Alderson. 1989. Genus *Streptomyces*, pp. 2452-2492. *In* S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Yamaguchi, T. 1965. Comprison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. J. of Bacteriol. 89 : 445-453.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ylihonko, K., J. Hakala, T. Kunnari and P. Mantsala. 1996. Production of hybrid anthracycline Antibiotics by heterologous expression of *Streptomyces nogalater* nogalamycin biosynthesis Genes. Microbiology. 142 : 1965-1972.

www.biogen.com

www.calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/faq/cellulase.htm/

www.liu.edu/.../micro

www.mib.uga.edu/.../Fall02

www.personal.psu.edu/.../jel5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Starch-Casein Agar ดัดแปลงจาก Kuster and Williams (1964)

แป้งมันสำปะหลัง	10.0 กรัม
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	2.0 กรัม
เคซีน (ไม่มีวิตามิน)	0.3 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.0 กรัม
เฟอรัสซัลเซต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.02 กรัม
วุ้น (agar)	18.0 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1.0 ลิตร
พีเอชเท่า กับ 7.0-7.2	

2. Potato dextrose agar

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2. กรองเอาน้ำใส รอจนเย็น ปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 7.0 หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยขวดปรับปริมาตร

3. เติมกลูโคสและวุ้น และต้มให้ละลาย

4. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. Spread plate techniques

เป็นเทคนิคในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้สารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยสารละลายเจือจางให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม โคโลนีของเชื้อจะเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง เลือกเก็บโคโลนีที่อยู่เดี่ยวๆ และมีลักษณะแตกต่างกันมาศึกษาต่อไป นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังนิยมใช้เพื่อตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เรียกว่า dilution plate count ในบางครั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ยังไม่ใช่เชื้อบริสุทธิ์ ควรนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Streak Plate Technique

วิธี spread plate

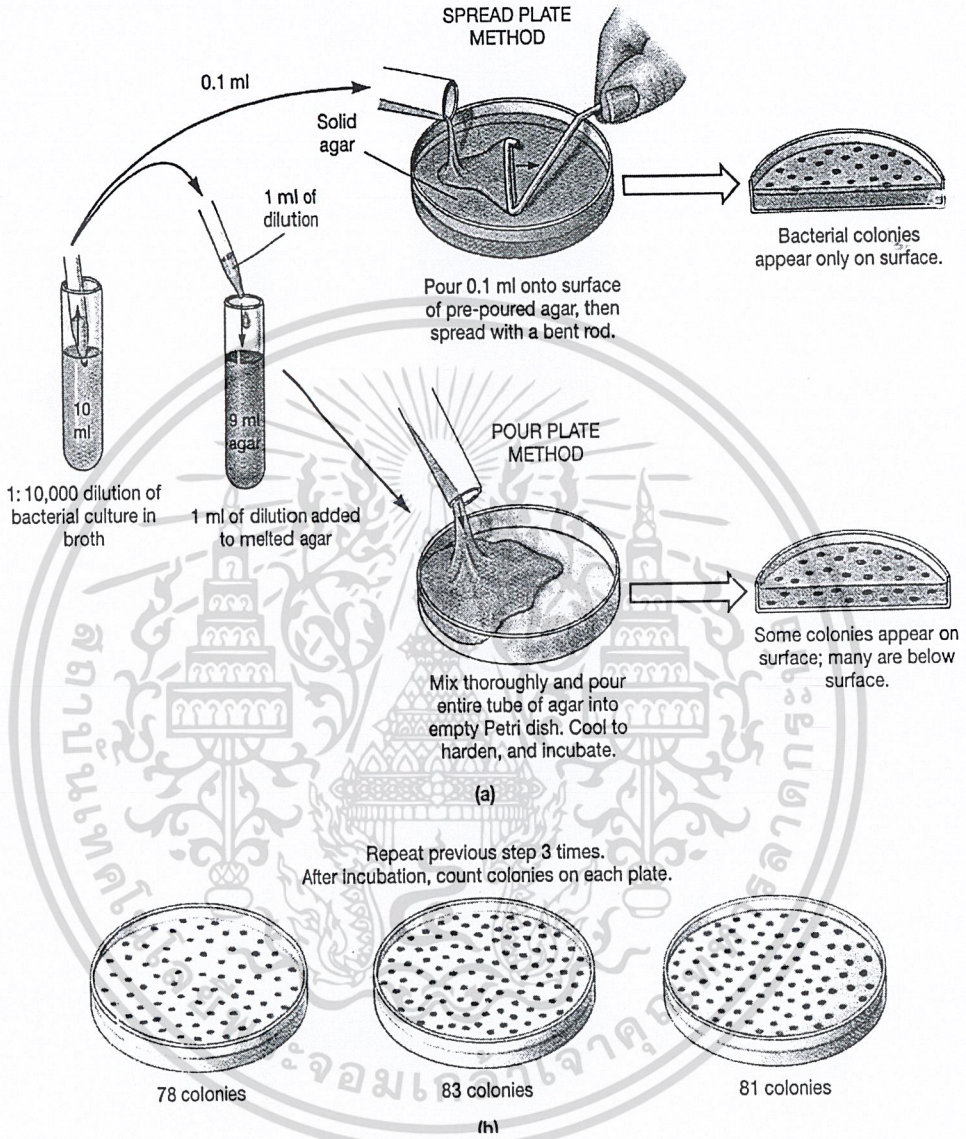
1. ปิเปตต์เชื้อที่ความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อ (ทำ 2 ซ้ำ)

2. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟและปล่อยให้เปลวไฟที่แท่งแก้วดับ ทิ้งไว้ให้แท่งแก้วเย็น

3. เปิดฝาจานเพาะเชื้อในข้อ 2.1 นำแท่งแก้วเกลี่ยหยดของเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วรูปตัวแอล ตามวิธีในข้อ 2.2

4. นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อ เลือกเก็บโคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ และมีลักษณะแตกต่างกันไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ข ที่ 1 ขั้นตอนของ Spread Plate Technique

ที่มา www.mib.uga.edu/.../Fall02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

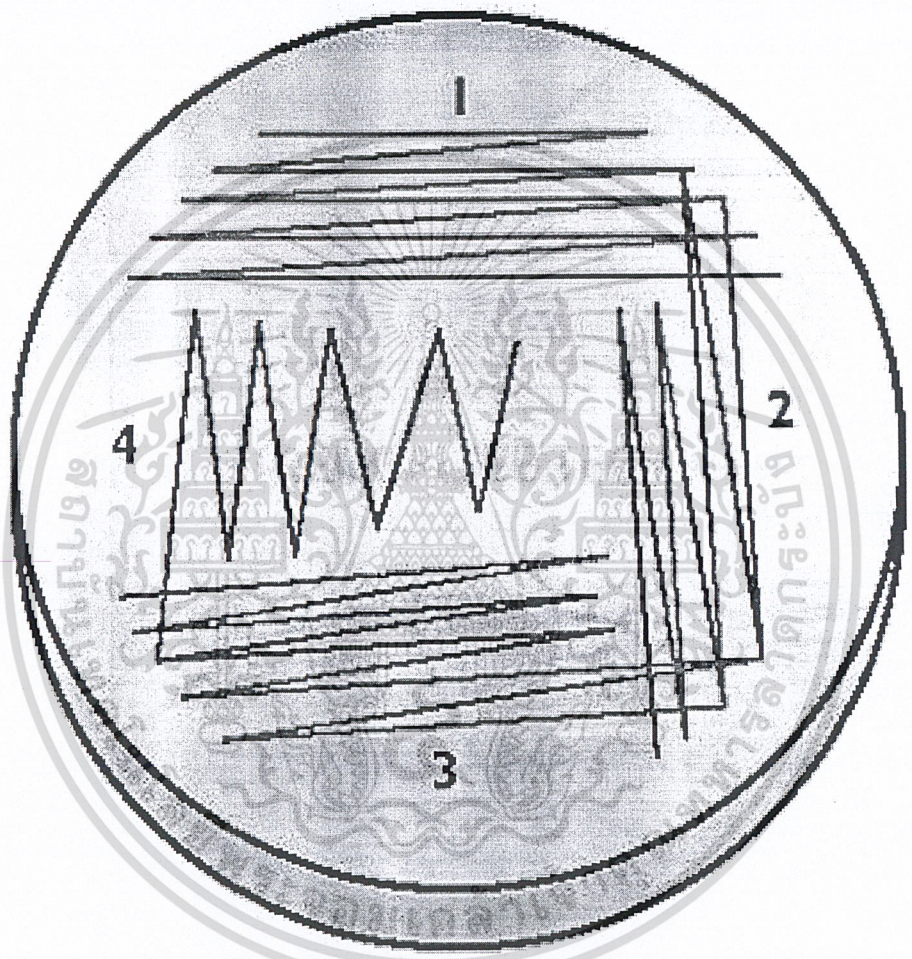
2. Streak Plate Technique

เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เชื้อเจือจางลงเรื่อยๆ โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่เผาไฟจนร้อนแดงและทิ้งให้เย็นแล้วแตะเชื้อ นำไปลาก (streak) บนผิวอาหารแข็งที่ปราศจากเชื้อ รอยลากที่จุดเริ่มต้นจะให้การเจริญที่ติดต่อกัน รอยลากถัดมาก็จะให้การเจริญที่ค่อยๆ แยกจากกัน จนกระทั่งรอยลากท้ายๆ จะให้โคโลนีที่แยกกันอย่างชัดเจน เนื่องจากแต่ละโคโลนีเจริญมาจาก 1 เซลล์ จึงถือได้ว่าโคโลนีที่แยกออกมาเดี่ยวๆ นั้นเป็นเชื้อบริสุทธิ์

วิธี streak plate

1. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15-20 มิลลิลิตร
2. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ไม่ควรให้มีหยดน้ำเกาะที่ผิวหน้า คว่ำจานอาหารลง
3. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ 2-3 วินาที เพื่อทำให้เย็น หรืออาจทำให้เย็นลงได้โดยนำมาแตะอาหารวุ้นในจานบริเวณที่ไม่มีเชื้อ
4. เขี่ยเชื้อที่ต้องการแยกให้ติดปลายลูป (loop) เล็กน้อย ลากเบาๆ ไปมา 3-4 ครั้ง (อย่าให้วุ้นแตก) ในบริเวณที่ 1
5. เผาปลายลูปให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาลากจากผิวหน้าบริเวณที่ 1 ไปยังบริเวณที่ 2
6. เผาปลายลูปให้ร้อนแดงอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาลากบนผิวหน้าจากบริเวณที่ 2 ไปยังบริเวณที่ 3
7. ลากจากบริเวณที่ 3 ไปยังบริเวณที่ 4 โดยไม่จำเป็นต้องเผาปลายลูปอีก ระวังอย่าให้เข้าไปทับบริเวณแรกที่ streak ไว้ก่อนแล้ว
8. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคว่ำจานลง เพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงบนผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ข ที่ 2 ลักษณะการลากเชื้อโดยใช้วิธี streak plate

ที่มา www.liu.edu/.../micro

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)

การย้อมแบบนี้ จะแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียที่ติดสีม่วง เรียกว่า แกรมบวก (gram-positive) และแบคทีเรียที่ติดสีแดง เรียกว่า แกรมลบ (gram-negative) การย้อมสีแบบนี้เป็นประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย แต่ในบางกรณีพวกแบคทีเรียแกรมบวกที่มีอายุมากกว่า 24 ชั่วโมง จะสูญเสียความสามารถในการติดสีม่วงทำให้เซลล์ติดสีแดง ลักษณะเช่นนี้ เรียกว่า gram-variable

วิธีการย้อมสีแบบ gram stain

1. หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
2. ล้างสีออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์และทิ้งไว้นาน 1 นาที
3. ล้างน้ำยาไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ หรืออะซิโตนแอลกอฮอล์ จนน้ำยาที่ล้างไม่มีสีติดออกมา (ใช้เวลาไม่เกิด 20 วินาที ให้ล้างออกด้วยน้ำทันที)
4. ย้อมทับ (counterstain) ด้วยสี safranin นาน 1 นาที
5. ล้างด้วยน้ำก๊อก แล้วปล่อยให้สไลด์แห้ง หรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
6. ตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

<u>สีย้อม</u>

1. Crystal violet (modified Hucker's)

สารละลาย A

Crystal violet	2.0	กรัม
95% ethanol	20.0	กรัม

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	กรัม

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง (ถ้าเกิดตะกอน กรองออก)

2. Iodine (Gram's)

Iodine crystal	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

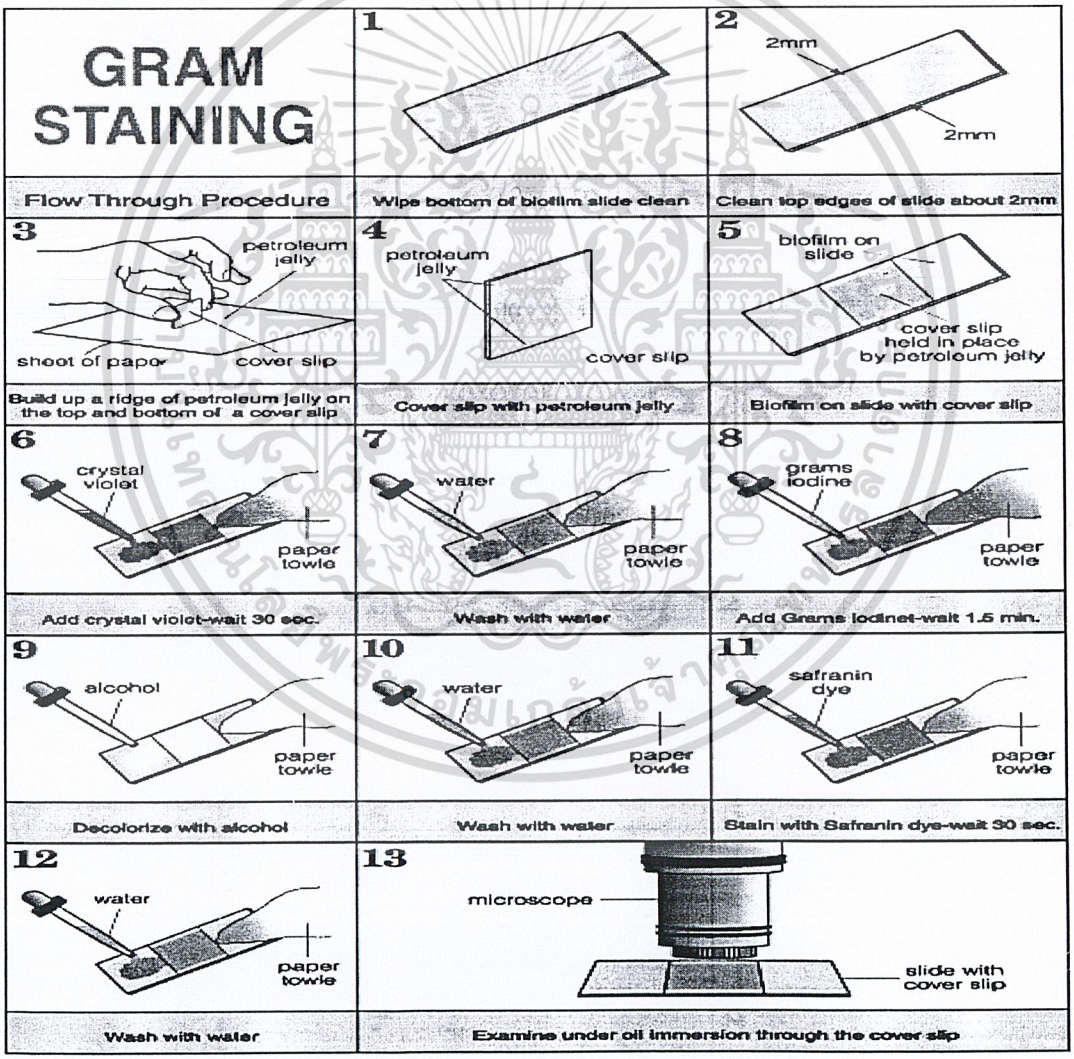
3. Safranin

Safranin O	0.25	กรัม
95% ethanol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Safranin 2.5% ด้วย ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

4. Acid alcohol

HCl conc.	3	มิลลิลิตร
95% ethanol	97	มิลลิลิตร



รูปภาคผนวก ข ที่ 3 การย้อมสีแบบแกรม

ที่มา www.personal.psu.edu/.../jel5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

1. อบหลอดเก็บตัวอย่างในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ในเดซิเคเตอร์ (desicator) รอจนเย็น ทำการชั่งหาน้ำหนักของหลอดโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง พร้อมจดบันทึก

2. เก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงจำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บส่วนใสไปทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และปริมาณแป้งมันสำปะหลัง

3. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง รินส่วนใสทิ้ง

4. นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่ในเดซิเคเตอร์ (desicator) รอจนเย็น ชั่งหาน้ำหนักหลอดพร้อมเซลล์แห้ง แล้วทำการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งจาก

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(A + B) - A}{5} \times 10^3$$

โดย A = น้ำหนักหลอดเก็บตัวอย่าง (กรัมต่อลิตร)

B = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

5. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์

ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยกิจกรรมของเอนไซม์หมายถึง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายของเอนไซม์บนผิวหน้าอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีจุลินทรีย์ ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (www.calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/faq/cellulase.htm/) โดยมีการดัดแปลงชนิดของสับสเตรทและสารเคมีในการย้อมสีบริเวณใสตามชนิดของเอนไซม์ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยวิธี point inoculation บนผิวหน้าอาหารทดสอบแข็ง NA ที่ประกอบด้วยสับสเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส (CM-cellulase) ใช้คาร์บ็อกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose) ส่วนเอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase) และเพคติเนส (Pectinase) ใช้ไซแลน(Xylan) และเพคติน(Pectin) เป็นสับสเตรทตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามรหัสจุลินทรีย์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในกรณีของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส ทำการชะเซลล์จุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารด้วย 1M Tris HCl ระดับความเป็นกรดด่าง 7.0 แล้วย้อมทับด้วย Congored 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างสีย้อมออกด้วย 1M NaCl วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณใสที่เกิดจากการย่อยสลายของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการย้อมสีเพื่อดูบริเวณใสโดยใช้สารละลาย Cetyltrimethyl ammoniumbromide 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมทับเป็นเวลา 5 นาที วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณใสที่เกิดขึ้นเพื่อนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ และเอนไซม์ไซลาเนสสามารถวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณใสหลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง

การเตรียม Tris HCl ทำโดยชั่ง Tris aminomethane [$NH_2C(CH_2OH)_3$} 2.43 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมา 25 มิลลิลิตรผสมกับ 1/10M HCl 45 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0

6. การวิเคราะห์กิจกรรมเอมไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส

กิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส วัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยคาร์บ็อกซีเมทธิวเซลลูโลส โดยวิธีการของ Miller(1959) บ่มสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางด้วยซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร และสารละลายคาร์บ็อกซีเมทธิวเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายคาร์บ็อกซีเมทธิวเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทอลองที่มีเอนไซม์ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อตามวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสวิธี Somogyi Nelson's method

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลส

1 ยูนิต (unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสให้ได้กลูโคส 1 ไมโครกรัม ในเวลา 20 นาที ภายในสภาวะของการวิเคราะห์

7. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสวิธี Somogyi Nelson (Nelson, 1944 ; Somogyi, 1952)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper regent) ประกอบด้วย

A : 10% $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตไฟไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

B : สารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต (Phosphste-tartrate solution) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มิลลิลิตร ตามด้วยโวเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4 (Anhydrous)) 120 กรัม เมื่อละลายดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatmam เบอร์ 4

ผสมสารละลาย (100 มิลลิลิตร) และ (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

1.2 สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : ไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องควรเก็บใส่ขวดสีชา

2 วิธีการวิเคราะห์

2.2 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ

2.3 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที สารละลายจะเป็นสีเขียว หรือน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

2.4 เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

2.5 นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3 การทำกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 20 40 60 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.1-2.3 นำค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานรวมของกลูโคส

8. การคำนวณหาปริมาณกลูโคส

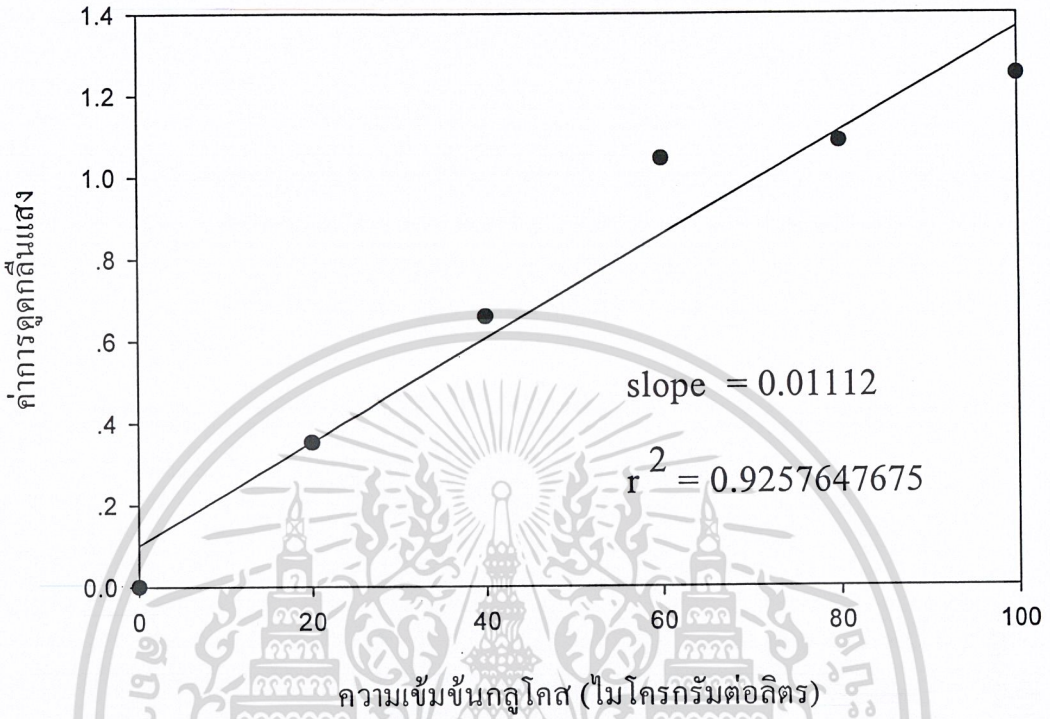
$$\text{ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{E \times 10^{-3} \times a}{b}$$

โดย E = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

a = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

b = ค่าคงที่ที่ได้จากความชันของกราฟกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ข ที่ 4 กราฟกลูโคสมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์ปริมาณแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีวัดค่าสีดัดแปลงวิธีการวัดจากวิธีการของ Mahin และ Carr(1923)

1. สารเคมี

1.1 โปแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) เข้มข้น 10 % (w/v)

1.2 โปแตสเซียมไอโอเดต (KIO_3) เข้มข้น 1/600 M

1.3 กรดแอซีติก เข้มข้น 2 N

2. การวิเคราะห์

2.1 เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม(ปริมาณแป้งประมาณ 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยน้ำกลั่น

2.2 ดูดสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วเติมกรดแอซีติกเข้มข้น 2 N 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3 เติมโปแตสเซียมไปโอไดด์เข้มข้น 10% จำนวน 0.25 มิลลิลิตร และเติมโปแตสเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอเดตเข้มข้น 1/600 M จำนวน 2.5 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันทันที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายแบลงค์ (blank) ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง (การวิเคราะห์แป้งแต่ละตัวอย่างควรทำ 4 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย) แล้วเปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลัง

3. การทำกราฟมาตรฐานของแป้งมันสำปะหลัง

ชั่งแป้งมันสำปะหลังด้วยเครื่องชั่งละเอียดให้ได้ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด 1 นาที รอจนสารละลายเย็นปรับปริมาตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 100 200 300 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายเหล่านี้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2-2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

10. การคำนวณหาปริมาณแป้งมันสำปะหลัง

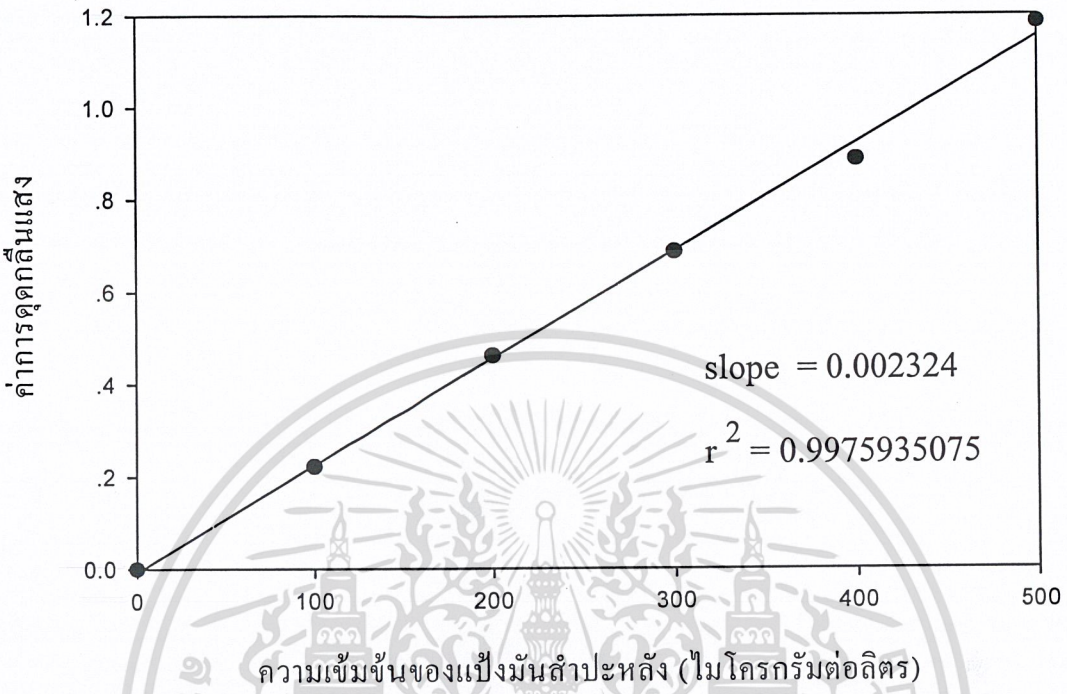
$$\text{ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{E \times 10^{-3} \times a}{b}$$

โดย E = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร

a = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

b = ค่าคงที่ที่ได้จากความชันของกราฟแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ข ที่ 5 กราฟแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน

11. วิธี Kirby-Bauer Test (paper disc)

เตรียมเปเปอร์ดิสก์ (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียม assay plate โดยเตรียม PDA ที่ spread เชื้อราไว้แล้ว ทำการ assay โดยจุ่มเปเปอร์ดิสก์ (paper disc) ลงในสารละลายใส (supernatant) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อเป็น 4 มุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดบริเวณใส (clear zone) ที่ เกิดขึ้น

12. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มประชากรตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป โดยใช้วิธีทางสถิติ คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Oneway-ANOVA)

การเตรียมไฟล์ข้อมูล

จะเริ่มที่การสร้างไฟล์ข้อมูล โดยไฟล์ข้อมูลจะต้องมีตัวแปรอิสระที่มีไว้สำหรับจำแนกประเภทของกลุ่ม ซึ่งบางทีนิยมเรียกว่า Treatment หรือ factor ในที่นี้ขอยกตัวอย่างไฟล์ข้อมูล project2.sav ซึ่งเป็นข้อมูลของโปรเจคนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 1 ตัวอย่างไฟล์ข้อมูล

	sam	czA	czL	var	var	var	var
1	7	0.7	0.5				
2	7	0.8	0.5				
3	7	0.8	0.6				

จากไฟล์ข้อมูล ตัวแปร sam จะเป็นตัวแปรที่เก็บค่า 3 ค่า คือ 7, 10 และ92 ซึ่งเป็นชนิดของเชื้อ แอคติโนมัยซีต 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ตัวแปร czA และ czL เป็นตัวแปรที่เก็บค่าบริเวณใส (clear zone) ที่เชื้อแอคติโนมัยซีตสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งเชื้อรา

สมมติว่าเราต้องการจะเปรียบเทียบบริเวณใส (clear zone) กับเชื้อ แอคติโนมัยซีตที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ และถ้าแตกต่าง ชนิดใดให้ผลการยับยั้งดีที่สุด จะมีขั้นตอนดังนี้

1. จากเมนู Analyze เลือก compare Mean/ Oneway-ANOVA...จะได้ไดอะล็อกบ็อกซ์
2. เลื่อนตัวแปร czA ไปไว้ในช่อง Dependent List และตัวแปร sam ไปไว้ในช่อง Factor
3. คลิกปุ่ม Post Hoc...เพื่อกำหนดระดับนัยสำคัญ และถ้าหากว่ามีความแตกต่างเกิดขึ้น ให้ทำการวิเคราะห์ Post Hoc Comparison ว่าตัวแปรคู่ใดแตกต่างกันบ้าง เลือก Duncan
4. คลิกปุ่ม Continue
5. คลิกปุ่ม Contrast...หรือ Options... (ถ้าต้องการระบุรายละเอียดอื่นๆเพิ่มเติม)
6. คลิกปุ่ม OK จะได้ผลลัพธ์ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 2 ผลลัพธ์ทางสถิติจากการป้อนข้อมูลการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*

ANOVA

CZA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.552	2	6.276	8.038	.000
Within Groups	138.198	177	.781		
Total	150.750	179			

ตารางภาคผนวก ข ที่ 3 ผลลัพธ์ทางสถิติจากการป้อนข้อมูลการยับยั้งเชื้อรา *Peranophythora lichi*

CZA

Duncan

	N	Subset for alpha = .05	
SAM		1	2
7.00	56	1.8589	
92.00	56	2.0500	
10.00	68		2.4765
Sig.		.238	1.000

หมายเหตุ ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 2 โดยเปลี่ยน czL แทน czA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CZA

Duncan

	N	Subset for alpha = 0.05												
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.00	4	1.2500												
34.00	4		2.2300											
53.00	4		2.2300											
29.00	4		2.3800											
81.00	4		2.6800	2.6800										
38.00	4			3.4200	3.4200									
47.00	4				3.4775									
20.00	4				3.5825	3.5825								
67.00	4				4.0200	4.0200	4.0200							
66.00	4					4.3750	4.3750	4.3750						

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 (ต่อ)

	N	Subset for alpha = 0.05												
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
66.00	4					4.3750	4.3750	4.3750						
86.00	4						4.5300	4.5300						
18.00	4							4.9175	4.9175					
40.00	4							5.1225	5.1225					
95.00	4								5.3800					
96.00	4								5.3800					
9.00	4								5.5800					
39.00	4									7.0200				
14.00	4									7.4200	7.4200			
6.00	4									7.5300	7.5300			
31.00	4									7.7800	7.7800			
55.00	4										7.9100			
10.00	4											9.3400		
4.00	4											9.4150		

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 (ต่อ)

	N	Subset for alpha = 0.05												
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
70.00	4											9.87	9.87	
7.00													10.208	
92.00														12.98
Sig.		1.0000	0.2780	0.0500	0.1470	0.0540	0.2180	0.0570	0.1170	0.0650	0.2370	0.1840	0.3680	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

A Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ [1] รหัสเชื้อแอคติโนมัยซีต

ตารางภาคผนวก ข ที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora anophythora lichi*

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CZL

Duncan

	N	Subset for alpha = 0.05								
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9
64.00	4	1.7600								
87.00	4	1.8100								
18.00	4	2.0500								
63.00	4		2.4300							
3.00	4		2.4500							
55.00	4			3.1200						
86.00	4			3.1200						
2.00	4			3.3800						
52.00	4				3.7400					
4.00	4					4.4200				
14.00	4					4.5300				

ตารางภาคผนวก ข ที่ 5 (ต่อ)

	N	Subset for alpha = 0.05								
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9
10.00	4					4.6700	4.6700			
6.00	4						5.0100			
31.00	4							5.8500		
70.00	4								7.0200	
7.00	4									8.0500
Sig.		0.1290	0.9110	0.1730	1.0000	0.1900	0.0610	1.0000	1.0000	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

A Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ [1] รหัสเชื้อแอคติโนมัยซีต

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobremae*

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CZLT

Duncan

	N	Subset for alpha = 0.05																	
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
6.00	4	2.1200																	
11.00	4	2.2100																	
59.00	4	2.6200	2.6200																
27.00	4	2.6700	2.6700																
87.00	4		3.0800	3.0800															
15.00	4		3.4200	3.4200	3.4200														
36.00	4			3.7400	3.7400	3.7400													
37.00	4				3.9800	3.9800	3.9800												
61.00	4				3.9800	3.9800	3.9800												
45.00	4					4.4700	4.4700												
77.00	4					4.5300	4.5300	4.5300											

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 (ต่อ)

	N	Subset for alpha = 0.05																
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
75.00	4						4.7500	4.7500	4.7500										
53.00	4						4.8300	4.8300	4.8300	4.8300									
8.00	4							5.3200	5.3200	5.3200	5.3200								
72.00	4								5.5200	5.5200	5.5200	5.5200							
93.00	4								5.5800	5.5800	5.5800	5.5800	5.5800						
94.00	4								5.5800	5.5800	5.5800	5.5800	5.5800						
18.00	4									5.6800	5.6800	5.6800	5.6800						
55.00	4										5.7400	5.7400	5.7400						
44.00	4										5.8700	5.8700	5.8700	5.8700					
69.00	4										5.8700	5.8700	5.8700	5.8700					
88.00	4										6.0800	6.0800	6.0800	6.0800	6.0800				
14.00	4											6.2800	6.2800	6.2800	6.2800	6.2800			
40.00	4											6.2800	6.2800	6.2800	6.2800	6.2800			
46.00	4											6.2800	6.2800	6.2800	6.2800	6.2800			
10.00	4											6.3600	6.3600	6.3600	6.3600	6.3600			

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 (ต่อ)

	N	Subset for alpha = 0.05																	
SAM[1]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
4	4											6.3800	6.3800	6.3800	6.3800	6.3800			
71	4												6.4500	6.4500	6.4500	6.4500			
78	4													6.6700	6.6700	6.6700			
31	4														6.8400	6.8400			
96	4															7.0400			
70	4																7.9600		
7	4																	10.1635	
92	4																		11.1685
Sig.		0.196	0.058	0.106	0.188	0.068	0.053	0.061	0.059	0.053	0.097	0.066	0.063	0.083	0.097	0.097	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

A Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ [1] รหัสเชื้อแอคติโนมัยซีต

ตารางภาคผนวก ข ที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์ซีเอ็ม-เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีต

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CZ

Duncan

	N	Subset for alpha = .05				
SAM[1]		1	2	3	4	5
14.00	4	.7875				
31.00	4		1.4150			
55.00	4		1.4200			
70.00	4		1.4325			
7.00	4			2.1875		
92.00	4				2.5750	
10.00	4					3.0000
Sig.		1.000	.863	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

หมายเหตุ [1] รหัสเชื้อแอคติโนมัยซีต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 7.0

ชั่วโมง	ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. niger*(มิลลิเมตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *P. lichi*(มิลลิเมตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	15.05	0	0	0.7	0.006
3	14.83	0	0	0.95	0.001
6	14.67	0	0	1.16	0.002
9	14.4	0	0	1.42	0.002
12	14.02	0	0	1.35	0.002
15	13.55	0	0	1.61	0.003
18	13.18	0	0	1.65	0.004
21	12.94	0.73	0.5	2	0.004
24	12.86	0.83	0.78	1.85	0.007
30	12.47	1.03	1	1.75	0.008
36	11.51	1.1	1.13	2	0.01
42	9.39	1.23	1.23	2.44	0.01
48	8.57	1.43	1.45	2.58	0.01
54	7.55	1.68	1.88	2.78	0.01
60	5.77	2.03	2	2.99	0.01
66	4.05	2.1	2.1	2.78	0.01
72	3.27	2.23	2.25	3.1	0.016
84	1.62	2.68	2.5	3.96	0.018
96	1.13	2.85	2.6	2.46	0.02
108	0.75	3.03	2.73	2.92	0.022
120	0.54	3.13	2.95	2.76	0.024

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 9 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 7.0

ชั่วโมง	ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. niger*(มิลลิเมตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *P. lichi* (มิลลิเมตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	14.95	0	0	0.66	0.001
3	14.62	0	0	1.17	0.001
6	14.26	0	0	1.44	0.001
9	14.05	0	0	1.38	0.001
12	13.02	0.5	0	1.29	0.001
15	12.64	1.83	0.6	1.71	0.001
18	11.52	2.5	0.68	1.87	0.002
21	10.79	3.08	0.88	1.95	0.002
24	9.37	3.55	1.23	2.09	0.003
30	7.4	4.4	1.78	2.09	0.003
36	5.81	1.3	0.63	2.31	0.005
42	3.61	1.48	0.9	2.33	0.006
48	1.3	1.9	1.23	2.05	0.006
54	0.8	2.1	1.25	2.03	0.006
60	0.15	2.23	1.3	2.61	0.02
66	0.09	2.43	1.75	4.21	0.027
72	0.04	2.5	1.8	3.45	0.028
84	0	2.78	2.1	2.7	0.034
96	0	3	2.53	2.61	0.034
108	0	3.23	2.7	2.5	0.04
120	0	3.33	2.98	2.66	0.051

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 10 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 ในอาหารเหลว starch casein ที่เติมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 7.0

ชั่วโมง	ปริมาณแป้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. niger*(มิลลิเมตร)	ผลการยับยั้งเชื้อรา *P. lichi* (มิลลิเมตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	14.98	0	0	0.9	0.001
3	14.71	0	0	0.94	0.002
6	14.45	0	0	1.23	0.002
9	14.19	0	0	1.18	0.002
12	13.55	0	0	1.27	0.008
15	13.29	0	0	1.44	0.003
18	12.73	0	0	1	0.003
21	12.06	0.48	0.3	1.27	0.004
24	11.76	0.78	0.5	1.27	0.005
30	9.87	0.98	0.88	2.07	0.006
36	9.04	1.1	1.08	2.27	0.008
42	8.98	1.48	1.18	2.22	0.009
48	5.25	1.88	1.48	2.4	0.012
54	4.45	2.3	1.75	2.81	0.013
60	3.34	2.48	1.8	2.35	0.018
66	2.64	2.5	2.08	2.5	0.02
72	1.5	2.63	2.2	2.6	0.021
84	1.35	2.8	2.48	2.5	0.028
96	0.86	2.93	2.68	2.37	0.038
108	0.57	3.13	2.8	2.22	0.052
120	0.2	3.28	3.13	2.27	0.148

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์

1. อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_p)

$$Q_p = \Delta P / \Delta t$$

2. ผลได้ของเซลล์ ($Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = \Delta C_x / \Delta C_S$$

3. อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (q_p)

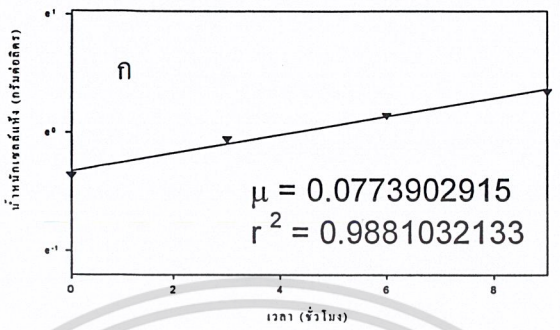
$$q_p = 1/C_x \times \Delta P / \Delta t$$

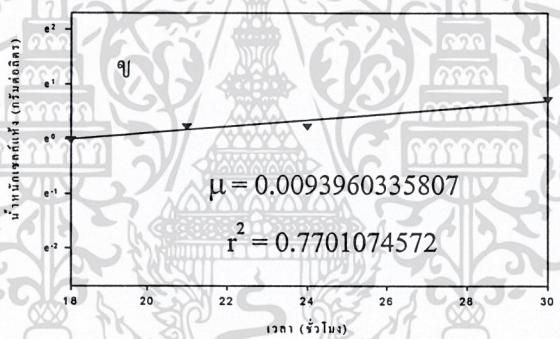
4. อัตราจำเพาะของการเติบโต (μ) โดยวิธีเขียนรูปกราฟในกระดาษเซมิล็อก

หมายเหตุ

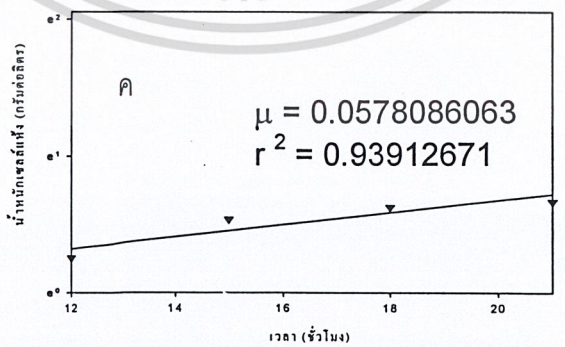
สัญลักษณ์		หน่วย
ΔP	ผลต่างของการเกิดผลิตภัณฑ์	กรัมต่อลิตร
Δt	ผลต่างของเวลา	ชั่วโมง
ΔC_x	ผลต่างของความเข้มข้นเซลล์	กรัมต่อลิตร
ΔC_S	ผลต่างของความเข้มข้นสับสเตรท	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





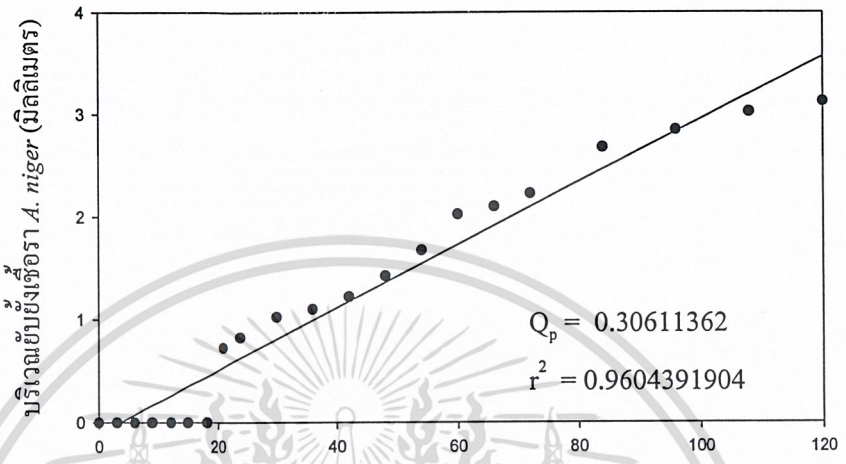
รูปภาคผนวก ค ที่ 6 อัตราจำเพาะของการเติบโต (μ) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต



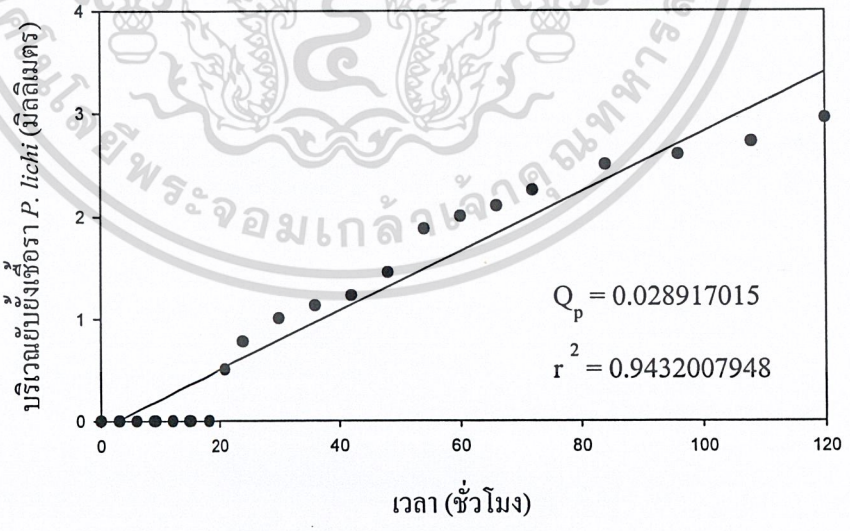
ก) รหัส sam 7 ข) รหัส sam 10 ค) รหัส sam 92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



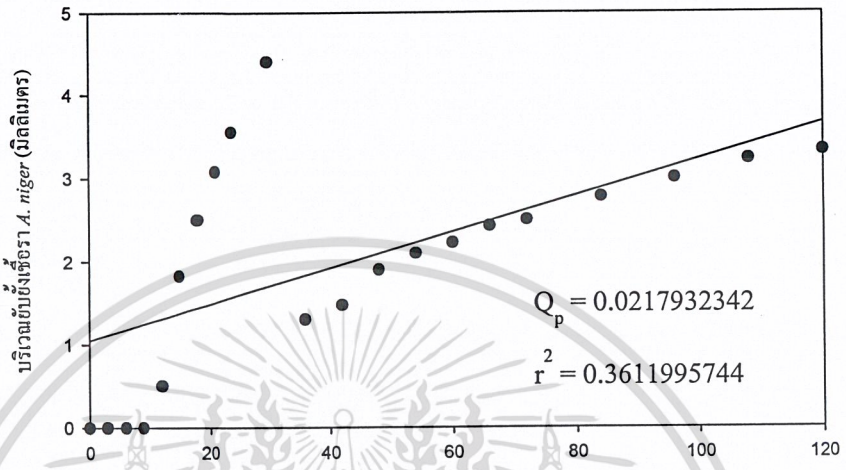
ข



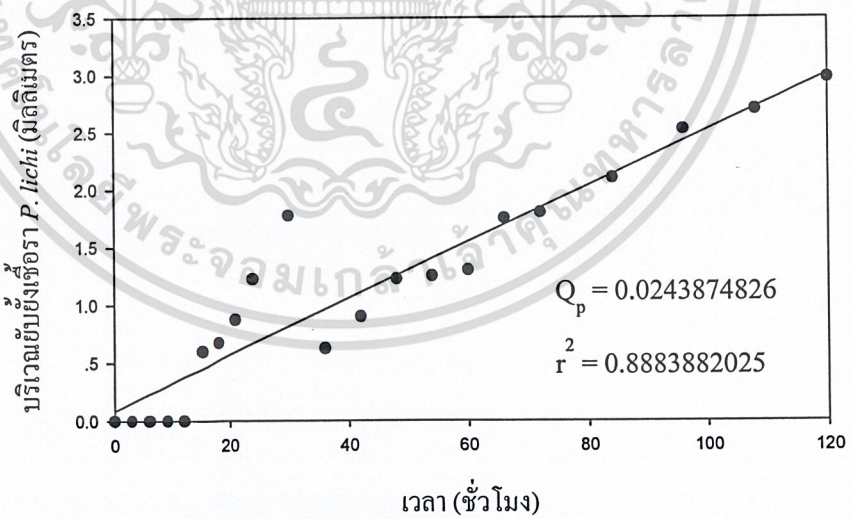
รูปภาคผนวก ค ที่ 7 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam7 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา ก) *Aspergillus niger* ข) *Peranophythora lichi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ให้ใช้ หาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



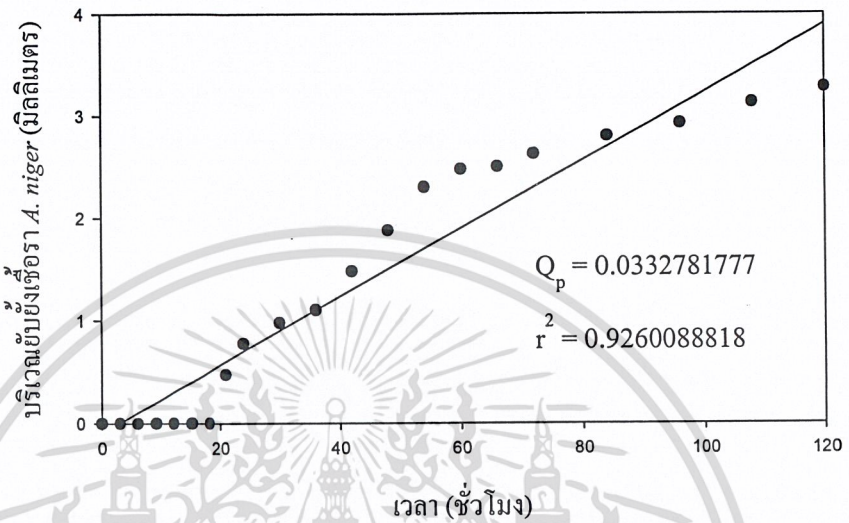
ข



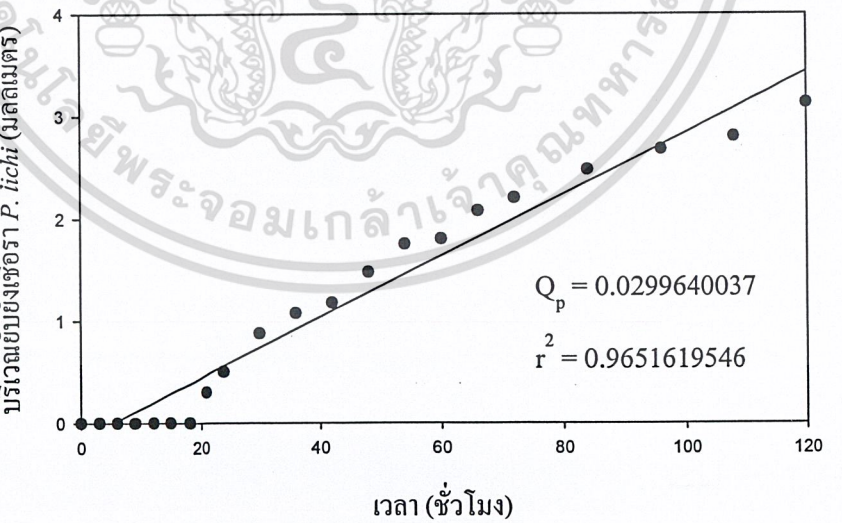
รูปภาคผนวก ค ที่ 8 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam10 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา ก) *Aspergillus niger* ข) *Peranophythora lichi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



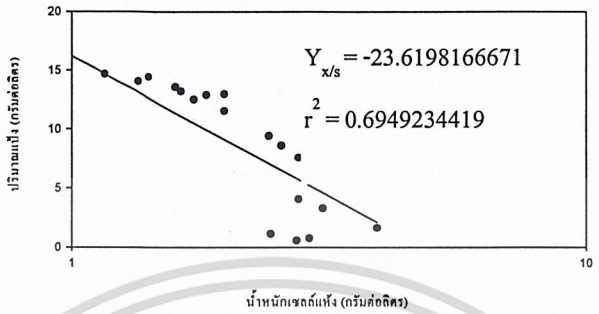
ข



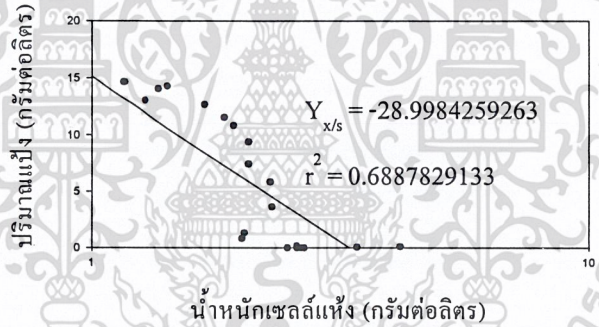
รูปภาคผนวก ค ที่ 9 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Q_p) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต รหัส sam92 โดยการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา ก) *Aspergillus niger* ข) *Peranophythora lichi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

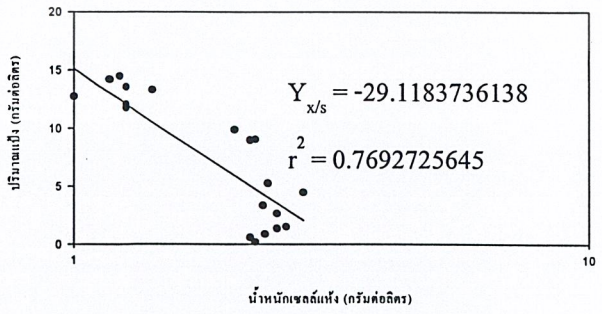
ก



ข



ค



รูปภาคผนวก ค ที่ 10 ผลได้ของเซลล์ ($Y_{x/s}$) ของเชื้อแอคติโนมัยซีต
ก) รหัส sam7 ข) รหัส sam10 ค) รหัส sam92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้