สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท

# Antimicrobial activity from crude extract of actinomycetes

นางสาวชลธิชา ลักษณาวงศ์

นายภัทรพงศ์ รติโภคิน

นายวงศกร พงศ์โสภิตานันท์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เลขหมู่ 117233
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 12310622
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๕๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM CRUDE EXTRACT OF ACTINOMYCETES

Miss Chonticha Luxsanawong

Mr. Phattharaphong Rathiphokin

Mr. Wongsakorn Phongsopitanun

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REAUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท

Antimicrobial activity from crude extract of actinomycetes

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวชลธิชา ลักษณาวงศ์

นายภัทรพงศ์ รติโภคิน

นายวงศกร พงศ์โสภิตานันท์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**ปีการศึกษา** ๒๕๕๓

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา ๒๕๕๓

| คณะกรรมการตรวจสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| รศ.ดวงใจ โอชัยกุล | |
| ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว | |
| ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวชลธิชา ลักษณาวงศ์

นายภัทรพงศ์ รติโภคิน

นายวงศกร พงศ์โสภิตานันท์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**ปีการศึกษา** ๒๕๕๓

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว

## บทคัดย่อ

ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน ๑๔ ไอโซเลต เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแต่ละไอโซเลตพบว่ามีลักษณะคล้ายแอคติโนมัยสีทในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) จำนวน ๑๑ ไอโซเลต และ สกุลไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) จำนวน ๓ไอโซเลต น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) พบว่าเชื้อไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ สามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด เช่น บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) และแคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) เมื่อสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซีเตต และแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารได้ ๙ ส่วน โดยสารส่วนที่ ๑ และ ๒ แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และ ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) สารส่วนที่ ๙ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) สำหรับสารส่วนที่ ๓ ๔ ๕ ๖ ๗ และ ๘ ไม่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Title** Antimicrobial activity from crude extract of actinomycetes

**Student** Miss Chonticha Luxsanawong

Mr. Phattharaphong Rathiphokin

Mr. Wongsakorn Phongsopitanun

**Degree** Bachelor of Science

**Major Program** I Industrial Microbiology

**Academic Year** 2010

**Advisor** Asst. Prof. Dr. Chitti Thawai

## Abstract

In the course of our investigation for the antibiotic producing actinomycetes, 14 isolates were investigated. The preliminary study of morphology revealed that 11 isolates were similar to the genus *Streptomyces* and 3 isolates were similar to the genus *Micromonospora.* The fermentation broths of all actinomycetes were tested for anti-microbial activities using agar well diffusion method. The result revealed that isolate PN1-1 exhibited the broad spectrum anti-microbial activity against the test microorganisms, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Candida albicans* ATCC 10231. The fermentation broth of PN1-1 was extracted with ethyl aceteate and the crude ethyl acetate extract was purified using chromatography technique and was devided into 9 fractions. Fraction 1 and 2 inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *and Bacillus subtilis* ATCC 6633. Fraction 9 showed the microstatic activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 while fraction 3, 4, 5, 6, 7 and 8 showed no anti-microbial activities.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท ในการทำโครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตติ ท่าไว ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆเกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ รวมทั้งชี้ให้เห็นข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดในในการทดลอง “ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท” (Antimicrobial activity from crude extract of actinomycetes) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่ให้คำแนะนะปรึกษาและกรุณาช่วยตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องต่างๆในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดในการจัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้

น.ส. ชลธิชา ลักษณาวงษ์

นาย ภัทรพงศ์ รติโภคิน

นาย วงศกร พงศ์โสภิตานันท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | i |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ii |
| กิตติกรรมประกาศ | iii |
| สารบัญ | iv |
| สารบัญตาราง | viii |
| สารบัญภาพ | ix |
| **บทที่ ๑ บทนำ** | |
| ๑.๑ ความเป็นมาและความสำคัญ | ๑ |
| ๑.๒ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | ๒ |
| ๑.๓ ขอบเขตของงานวิจัย | ๒ |
| ๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | ๒ |
| **บทที่ ๒ ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | |
| ๒.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีท | |
| ๒.๑.๑ ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท | ๓ |
| ๒.๑.๒ ความสำคัญของแอคติโนมัยสีท | ๔ |
| ๒.๑.๓ ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา | ๕ |
| ๒.๑.๓.๑ ลักษณะทั่วไปของเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยเซส | ๕ |
| ๒.๑.๓.๒ ลักษณะทั่วไปของเชื้อในสกุลไมโครโมโนสปอรา | ๖ |
| ๒.๒ สารปฏิชีวนะ | |
| ๒.๒.๑ การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ | ๗ |
| ๒.๒.๒ สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท | ๘ |
| ๒.๓ การดื้อยาของจุลินทรีย์ | |
| ๒.๓.๑ การถ่ายทอดการดื้อยา | ๙ |
| ๒.๔ ชีววิทยาของเชื้อที่นำมาทดสอบ | |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)


หน้า

๒.๔.๑ เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ๙

๒.๔.๒ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ๑๑

๒.๔.๓ บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) ๑๒

๒.๔.๔ ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) ๑๓

๒.๔.๕ สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) ๑๓

๒.๔.๖ แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ๑๔

**บทที่ ๓ วิธีการดำเนินงานวิจัย**

๓.๑ อุปกรณ์ ๑๖

๓.๒ เครื่องมือ ๑๖

๓.๓ สารเคมี ๑๗

๓.๔ วิธีการทดลอง

๓.๔.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา ๑๗

๓.๔.๒ การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท ๑๗

๓.๔.๒.๑ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ ๑๗

๓.๔.๒.๒ การศึกษาการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ๑๘

๓.๔.๒.๓ การย่อยสลายแป้ง ๑๘

๓.๔.๒.๔ การย่อยสลายและตกตะกอนโปรตีนนม ๑๙

๓.๔.๒.๕ การย่อยสลายเจลาติน ๑๙

๓.๔.๒.๖ การย่อยสลายไนเตรท ๑๙

๓.๔.๒.๗ การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ๑๙

๓.๔.๒.๘ การเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ๑๙

๓.๔.๒.๙ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ๑๙

๓.๔.๓ การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้น โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) ๒๐

๓.๔.๓.๑ การเพาะเลี้ยงเชื้อ ๒๐


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)


หน้า

๓.๔.๓.๒ การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๒๐

๓.๔.๓.๓ การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ ๒๐

๓.๔.๓.๔ การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน ๒๐

๓.๔.๔ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในปริมาณมาก

๓.๔.๔.๑ การเตรียมหัวเชื้อ ๒๑

๓.๔.๔.๒ การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต้องการศึกษา ๒๑

๓.๔.๔.๓ การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อ ๒๑

๓.๔.๕ การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง ๒๒

๓.๔.๖ การแยกสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ๒๒

๓.๔.๗ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของส่วนที่แยกได้

๓.๖.๗.๑ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยเทคนิคเอกาดิสก์-ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion) ๒๒

๓.๖.๗.๒ การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโทกราฟี (bioautographic method) ๒๓

**บทที่ ๔ ผลการทดลอง**

๔.๑ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท ๒๔

๔.๑.๑ ลักษณะทางฟีโนไทป์ ๒๔

๔.๒ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต ๓๖

๔.๓ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในปริมาณมาก ๔๑

๔.๔ การแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี ๔๑

๔.๕ ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกได้โดยเทคนิคเอกาดิสก์ดิฟฟิวชันและไบโอออโทกราฟ ๔๓


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| **บทที่ ๕ สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง** | ๔๗ |
| **เอกสารอ้างอิง** | ๔๘ |
| **ภาคผนวก ก** | ๕๑ |
| **ภาคผนวก ข** | ๕๖ |





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ๑. | สารทุติยภูมิโดยประมาณที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ | ๔ |
| ๒. | ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท | ๘ |
| ๓. | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทำการศึกษา | ๓๓ |
| ๔. | การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตต่างๆ | ๓๔ |
| ๕. | ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำหมักเชื้อโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน | ๓๗ |
| ๖. | สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตที่แยกได้โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี | ๔๓ |
| ๗. | ผลทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของแต่ละส่วนที่แยกได้โดยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน | ๔๔ |
| ๘. | แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขององค์ประกอบของสารส่วนที่ ๑-๙ (F1-F9) ที่ระดับอาร์เอฟต่างๆ | ๔๕ |


สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ๑. | ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) เมื่อมองผ่านเลนส์ทำงานระยะไกล (long working distance lens) กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า | ๕ |
| ๒. | (ก) ลักษณะและสีของโคโลนีของเชื้อไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*)บนอาหารไอเอสพี๒ | ๖ |
| | (ข) ลักษณะสปอร์ของไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) เมื่อมองผ่านเลนส์ทำงาน-ระยะไกลกำลังขยาย ๔๐๐ เท่า | |
| ๓. | (ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichea coli* ATCC 25922) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) | ๑๐ |
| | (ข) ลักษณะเซลล์ของเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) เมื่อย้อมแกรมกำลังขยายหนึ่งพันเท่า | |
| ๔. | (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) | ๑๒ |
| | (ข) ลักษณะเซลล์ของสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยายหนึ่งพันเท่า | |
| ๕. | (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) | ๑๓ |
| | (ข) ลักษณะเซลล์ของบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายหนึ่งพันเท่า | |
| ๖. | (ก) แสดงลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารของเชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) | ๑๔ |
| | (ข) ลักษณะการเรียงตัวแบบกลุ่มสี่เซลล์ (tetrad) ของไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) | |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป(ต่อ)


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ๗. | (ก) แสดงลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) ของเชื้อสูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) (ข) ลักษณะเซลล์ของสูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายหนึ่งพันเท่า | ๑๕ |
| ๘. | แสดงขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต | ๒๑ |
| ๙. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๕-๑ | ๒๔ |
| ๑๐. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอ็นอาร์๑-๑๓ | ๒๕ |
| ๑๑. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๙-๓ | ๒๖ |
| ๑๒. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต อาร์บี๓-๑ | ๒๖ |
| ๑๓. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๖ | ๒๗ |
| ๑๔. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสที๐๔-๐๕ | ๒๘ |
| ๑๕. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสพี๒๐๘-๐๑ | ๒๘ |
| ๑๖. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสพี๒๐๖-๐๘ | ๒๙ |
| ๑๗. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตเอส๗เอฟ-๐๔ | ๒๙ |
| ๑๘. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๖ | ๓๐ |
| ๑๙. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ | ๓๑ |
| ๒๐. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอส๗เอฟ-๒๕ | ๓๑ |
| ๒๑. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๓ | ๓๒ |
| ๒๒. | ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสที๐๑-๐๔ | ๓๒ |
| ๒๓. | การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) | ๓๘ |
| ๒๔. | การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อแคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) | ๓๘ |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป(ต่อ)


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| ๒๕. | การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) | ๓๙ |
| ๒๖. | การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) | ๓๙ |
| ๒๗. | การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichia coli* ATCC 25922) | ๔๐ |
| ๒๘. | การทดสอบ เอกาเวลดิฟฟิวชันของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อสูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) | ๔๐ |
| ๒๙. | ผลการทดสอบไบโอออโทกราฟขององค์ประกอบสารส่วนที่ ๑ และ ๒ ต่อเชื้อ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) | ๔๖ |
| ๓๐. | ผลการทดสอบไบโอออโทกราฟขององค์ประกอบส่วนที่ ๑ และ ๒ ต่อเชื้อ ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) | ๔๖ |
| ๓๑. | ผลการทดสอบไบโอออโทกราฟขององค์ประกอบส่วนที่ ๑, ๒ และ ๓ ต่อเชื้อ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) | ๔๖ |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ ๑
# บทนำ

## ๑.๑ ความเป็นมาและความสำคัญ

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. ๑๙๒๙ ที่ อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิ่ง (Alexander Flaming) ได้สังเกตจานเพาะเลี้ยงเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ที่ถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อราและพบว่าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของราซึ่งทำให้เกิดการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดแรก นักวิทยาศาสตร์จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆจากจุลินทรีย์เรื่อยมา นับตั้งแต่ปี ๑๙๔๐ เป็นต้นมา สารปฏิชีวนะหลายพันชนิดได้ถูกคัดแยกและทำการศึกษาในห้องทดลอง หลายชนิดยังไม่พบความสำคัญในทางการแพทย์แต่บางชนิดได้นำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งการค้นพบสารปฏิชีวนะนี้ทำให้วงการแพทย์ประสบความสำเร็จในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infection desease) เป็นอย่างมาก

เนื่องจากมีการใช้สารปฏิชีวนะอย่างแพร่หลาย เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดจึงมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในปัจจุบันจึงพบปัญหาเชื้อดื้อยาเป็นจำนวนมากเนื่องจากสารปฏิชีวนะชนิดเดิมไม่สามารถรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อเหล่านี้ได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและค้นคว้าหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและสามารถรักษาโรคติดเชื้อได้ในวงกว้างเพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะที่มีอยู่เดิม

เชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมีไมซีเลียมแตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม ถ้าสปอร์มีถุงหุ้มเรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) ซึ่งอยู่ใน สปอร์แรงเจียม (sporangium) สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งแล้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งในบรรดาสารปฏิชีวนะจำนวน ๒ ใน ๓ ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดนั้นสร้างมาจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท ซึ่งสารปฏิชีวนะจัดเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญที่แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น แอคติโนมัยสีทจึงเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในการศึกษาและค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆที่เป็นความหวังของนักวิทยาศาสตร์ว่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และแก้ไขปัญหาเชื้อดื้อยาในปัจจุบันได้

จากความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีทข้างต้น โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และทำการแยกสารเป็นส่วนๆ (fraction) ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะเบื้องต้น ตลอดจนทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาสารปฏิชีวนะในอนาคตต่อไป

## ๑.๒ วัตถุประสงค์โครงงานพิเศษ

๑.๒.๑ เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ

๑.๒.๒ เพื่อเพาะเลี้ยงและสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยสีท

๑.๒.๓ เพื่อทำการแยกสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็นส่วนๆ (fraction) โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี

๑.๒.๔ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบที่แยกได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีท

## ๑.๓ ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้เบื้องต้นโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ จากนั้นนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวยีสต์สกัด มอลต์สกัด (yeast extract malt extract broth, ISP2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) แล้วคัดเลือกเชื้อที่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีที่สุดมาเพาะเลี้ยงกับอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) ในปริมาณมาก จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตตและทำการแยกสารสกัดที่ได้ด้วยกระบวนการทางโครมาโทกราฟีพร้อมนำส่วนที่แยกได้ (fraction) มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion) และวิธีไบโอออโทกราฟ (bioautograph)

## ๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๑.๔.๑ ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทำการศึกษา

๑.๔.๒ ทราบถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิล-อะซิเตต จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีท

๑.๔.๓ ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเบื้องต้น

๑.๔.๔ อาจสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบและ/หรือแยกสารออกเป็นส่วน (fraction) ตลอดจนทราบถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสารนั้นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ ๒
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## ๒.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีท (actinomycete)

### ๒.๑.๑ ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใยเป็นสายคล้ายรา ซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณโมลร้อยละของเบสกวานีนและไซโตซีนที่สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือประมาณร้อยละ ๕๕-๗๘ แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน แต่ก็มีบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการเพียงเล็กน้อย โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียอื่นๆ คือมีลักษณะทึบแสงเส้นใยเหนือผิวอาหารแห้ง และมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า และสามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

แอคติโนมัยสีทมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างราและแบคทีเรียโดยลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่คล้ายรา คือ เส้นใยของแอคติโนมัยสีทจะแตกกิ่งก้านคล้ายรา แอคติโนมัยสีทหลายกลุ่มสามารถสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหารตรงปลายมีโคนิเดีย (conidia) คล้ายกับลักษณะเส้นใยและสปอร์ของราแต่เส้นใยของแอคติโนมัยสีทมีขนาดเล็กกว่าราโดยแอคติโนมัยสีทจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเพียง ๐.๕ – ๑.๐ ไมโครเมตร ซึ่งรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยถึง ๕ – ๕๐ ไมโครเมตร

แอคติโนมัยสีทถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียเนื่องจากแอคติโนมัยสีทมีผนังเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลสหรือไคติน แต่ประกอบด้วยสารเชิงซ้อนของน้ำตาลและกรดอะมิโนซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียแกรมบวกและถูกทำลายได้โดยแบคเทอริโอฟาจและสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย และเมื่อศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์พบว่าแอคติโนมัยสีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังนั้น จึงจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทไว้ในกลุ่มของแบคทีเรีย (สินีนาถและคณะ, ๒๕๕๒)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๒.๑.๒ ความสำคัญของแอคติโนมัยสีท**

ในปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งทางเทคโนโลยีชีวภาพ พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา เพราะนอกจากจะพบว่ามีการสร้างสารเมตาบอไลท์ที่สำคัญหลายชนิด และมีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่หลากหลายแล้วแอคติโนมัยสีทยังสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้อีกหลายชนิดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน(รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘) ในธรรมชาติบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท คือ ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน (ชาญวิทย์, ๒๕๕๒)

ในด้านการสร้างสารทุติยภูมิพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด ได้แก่สกุล สเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) และเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆแล้ว แอคติโนมัยสีทก็ยังเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารเหล่านี้เป็นจำนวนมากที่สุดด้วยเช่นกัน โดยพบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากถึง ๒ ใน ๓ ของสารปฏิชีวนะทั้งหมดที่เรารู้จักกันในปัจจุบัน และในบรรดาสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีมากถึงร้อยละ ๘๐ ที่สร้างมากจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลสเตรปโตมัยซีส สำหรับสกุลที่สร้างได้มากรองลงมาได้แก่ ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) และถ้าหากจะรวมสารทุติยภูมิที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนอกเหนือจากสารปฏิชีวนะแล้วสารที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทก็ยังคงมีมากที่สุดอยู่ดี คือมากกว่า ร้อยละ ๖๐ (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

**ตารางที่ ๑** สารทุติยภูมิโดยประมาณ ที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ

| แหล่งที่มา | สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | สารปฏิชีวนะ | | สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ | | รวมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด |
| | ทั้งหมด | สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ | ไม่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ | สารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ | |
| แบคทีเรีย | ๒๙๐๐ | ๗๘๐ | ๙๐๐ | ๑๖๘๐ | ๓๘๐๐ |
| แอคติโนมัยสีท | ๘๗๐๐ | ๒๔๐๐ | ๑๔๐๐ | ๓๘๐๐ | ๑๐๑๐๐ |
| รา | ๓๙๐๐ | ๒๓๐๐ | ๓๗๐๐ | ๖๐๐๐ | ๘๖๐๐ |
| ทั้งหมด | ๑๖๕๐๐ | ๖๐๐๐ | ๖๐๐๐ | ๑๑๕๐๐ | ๒๒๕๐๐ |

ที่มา : Bérdy (๒๐๐๕)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๒.๑.๓ ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา**

**๒.๑.๓.๑ ลักษณะทั่วไปของเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)**

เส้นใย (vegetative hyphae) มีขนาด ๐.๕ ถึง ๒.๐ ไมโครเมตร สามารถแตกกิ่งแขนงได้มากแต่ไม่ค่อยแตกหักเป็นท่อน (รูปที่ 1 ) เส้นใยเหนือผิวอาหารที่เจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ตั้งแต่สามถึงหลายสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ น้อยชนิดมากที่สามารถสร้างสปอร์ต่อเป็นสายสั้นๆที่เส้นใยใต้ผิวอาหาร บางชนิดอาจสร้างโครงสร้างที่คล้ายสเคลอโรเทีย (sclerotia) พิคนิเดีย (pycnidia) อับสปอร์ (sporangia) และซินนีมาตา (synnemata) ได้ สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ สร้างโคโลนีได้หลายแบบ ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหาร สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสีและอาจมีรงควัตถุที่สามารถแพร่ลงในอาหารได้ด้วย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หนึ่งชนิดหรือมากกว่า ต้องการอากาศ ติดสีแกรมบวกแต่ไม่ติดสีทนกรด (acid fast) อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง ๒๕ ถึง ๓๕ องศาเซลเซียส แต่บางชนิดก็เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า พีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง ๖.๕ ถึง ๘.๐ ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดแอล-ไดอะมิโนพิมิลิกชนิดแอลแอล (LL-diaminopimelic acid) ไม่มีกรดไมโคลิค พบอยู่ทั่วไปในดินรวมทั้งซากเน่าเปื่อย มีน้อยชนิดที่ทำให้เกิดโทษในคนและสัตว์แต่ในบางชนิดก็อาจก่อให้เกิดโรคใบพืชได้ มีปริมาณโมลของเบสกวานีนและไซโตซีนร้อยละ ๖๙ ถึง ๗๘ (Williams, Goodfellow and Alderson, ๑๙๘๙ อ้างถึงโดยรัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

( ก ) ( ข )

**รูปที่๑** ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) เมื่อมองผ่านเลนส์ทำงานระยะไกล (long working distance lens) กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า (ก) ลักษณะเชื้อ สเตรปโตมัยซิสที่เป็นเส้นสาย (ข) ลักษณะสปอร์ที่ขดเป็นเกลียวของสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๒.๑.๓.๒ ลักษณะทั่วไปของเชื้อในสกุลไมโครโมโนสปอรา**

เส้นใยเจริญดี แตกกิ่งแขนง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ ๐.๕ ไมโครเมตร สปอร์ไม่เคลื่อนที่และถูกสร้างเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรืออาจมีก้านทั้งสั้นหรือยาวก็ได้ ก้านชูสปอร์เจริญแบบ โมโนโพเดียล (monopodial) หรือบางทีอาจเป็น ซิมโพเดียล (sympodial) ไม่มีเส้นใยเหนือผิวอาหาร หรือบางที่อาจจะปรากฏให้เห็นไม่แน่นอน อาจมีสีขาวหรือสีเทา ติดสีแกรมบวก ไม่ติดสีทนกรด (acid fast) ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมิลิกแอซิดชนิดมีโส (*meso*-DAP) และ/หรือ อนุพันธ์ของสาม-ไฮดรอกซี (3-hydroxy derivative) ของกรดไดอะมิโนพิมิลิกแอซิดชนิดมีโสและไกลซีน ในสิ่งที่ได้จากการไฮโดร-ไลซ์เซลล์ทั้งเซลล์ (whole-cell hydrolysate) พบน้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส โคโลนีบนอาหารแข็งในระยะแรกๆจะมีสีเหลืองซีดสีส้มจางแล้วจึงจะให้สีส้ม สีแดง น้ำตาล น้ำเงิน-เขียว หรือสีม่วง ในเวลาต่อมาโคโลนีที่แก่แล้วจะมีสีเข้มขึ้น ซึ่งมักสร้างสปอร์ที่มีสีน้ำตาลดำ เขียวดำ หรือดำ แล้วจึงค่อยมีเมือก สีของเส้นใยมักเปลี่ยนไปตามค่าของพีเอชด้วย ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) มีลักษณะที่เด่นชัดคือสร้างสปอร์เดี่ยวๆที่เส้นใยใต้ผิวอาหาร เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง ๒๐-๔๐ องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน ๕๐ องศาเซลเซียส และ พีเอชไม่ต่ำกว่า ๖.๐ โมลร้อยละของเบสกวานีนและไซโตซีนอยู่ในช่วง ๗๑ ถึง ๗๓ (kawamoto, ๑๙๘๙ อ้างถึงโดยรัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

(ก) (ข)

**รูปที่ ๒** (ก) ลักษณะและสีของโคโลนีของเชื้อไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) บนอาหาร ไอเอสพี-๒ (ISP2) (ข) ลักษณะสปอร์เมื่อมองผ่านเลนส์ทำงานระยะไกล กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า
ที่มา http:// =hbmmd.hboi.edu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ๒.๒ สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง ยาหรือสารเคมีใดๆที่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียหรือราสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้ สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และเภสัชวิทยาต่างกัน (กำพล, ๒๕๓๘) สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมักเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างสารเหล่านี้ในช่วงปลายล็อกเฟส (late log phase) จนถึงช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) (กฤษณ์, ๒๕๔๘)

**๒.๒.๑ การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ** (กำพล, ๒๕๓๘)

การแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้เป็น ๖ กลุ่มใหญ่ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ

**๒.๒.๑.๑ กลุ่มที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (cell wall)** ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วย เพนิซิลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) แวนโคมัยซิน (vancomicin) เบซิเตรซิน (basitracin) และ ไซโคลเซอรีน (cycloserine) โดยยาในกลุ่มนี้มีผลทำลายผนังหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกและตาย จึงจัดเป็นยากลุ่มที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง (bactericidal action)

**๒.๒.๑.๒ กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)** ยากลุ่มนี้มีผลทำให้ของเหลวภายในเซลล์ซึมออกมานอกเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymyxin) โคลิสติน (colistin) และแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B)

**๒.๒.๑.๓ กลุ่มที่มีผลขัดขวางการสร้างโปรตีน** ยากลุ่มนี้มีผลยับยั้งการทำงานของไรโบโซม (ribosome) ซึ่งเป็นกลจักรที่สำคัญของเซลล์ในการสร้างโปรตีน จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic action) โดยไม่มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของภูมิต้านทานของร่างกายในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ ยากลุ่มนี้แบ่งย่อยออกได้เป็น ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลต่อไรโบโซมชนิด ๕๐เอส (50S) ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (chloranphenicol) คลินดามัยซิน (clindamycin) และอิริโธมัยซิน (erythromycin) ส่วนกลุ่มที่มีผลต่อไรโซโซมชนิด ๓๐เอส (๓๐S) ได้แก่ เตตราซัยคลิน (tetracycline)

**๒.๒.๑.๔ กลุ่มที่มีผลทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนผิดปกติ** เกิดจากการที่ยาจับกับไรโบโซมชนิด ๓๐เอส (30S) และทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ เป็นผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลาย ยาจึงมีสมบัติในการฆ่าเชื้อโดยตรง ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ สเตรปติโนมัยซิน (streptinomycin) และอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) กานามัยซิน (kanamycin) และนีโอมัยซิน (neomycin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๒.๒.๑.๕ กลุ่มที่มีผลยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก(nucleic acid)** ยากลุ่มนี้ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ยากลุ่มนี้ได้แก่ ไรแฟมฟิน (rifampin) เมโทรนิดาโซล (metronidazole) และยาในกลุ่มควิโนโลน (quinolone)

**๒.๒.๑.๖ กลุ่มที่ขัดขวางกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์** ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ และไตรเมโทพริม ซึ่งจะไปยับยั้งขบวนการเมทาบอลิซึมของกรดโฟลิค ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไปได้ ยาจึงออกฤทธิ์แค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

**๒.๒.๒ สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท**

สารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นจากเชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์จะอยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยตัวอย่างสารที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้แก่

**ตารางที่ ๒** ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

| ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีท | สารปฏิชีวนะที่สร้าง |
|---|---|
| สเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอสเอฟ ๒๕๘๗ (*Streptomyces* sp. SF 2587) | แอนคิโนมัยซิน (ankinomycin) |
| สเตรปโตมัยเซส เวอติซิลลัส เอที ๒๙๑ (*Streptomyces* verticillus AT 291) | เบรโอมัยซิน เอ$_2$ (bleomycin a$_2$) |
| แซคคาโรโพลีสปอรา อิริทราอี (*Saccharopolyspora erythraea*) | อิริโทรมัยซิน (erythromycin) |
| สเตรปโตมัยเซส ริโมซัส (*Streptomyces rimosus*) | พาโรโมซัยซิน (paromocycin) |
| สเตรปโตมัยเซส คานามัยซีติคัส (*Streptomyces kanamyceticus*) | คานามัยซิน (kanamycin) |
| ไมโครโมโนสปอรา เพอพิวเรีย (*Micromonospora purpurea*) | เจนตามัยซิน (gentamicin) |
| สเตรปโตมัยเซส สเปกทาบิลิส (*Streptomyces spectabilis*) | สเปกทิโนมัยซิน (spectinomycin) |
| อะไมโคลาทอปเซส โอเรียนทาลิส (*Amycolatopsis orientalis*) | แวนโคมัยซิน (vancomycin) |
| ไมโครโมโนสปอรา กรีซีโอรูบิดา (*Micromonospora griseorubida*) | มายซินามิซิน ๒ (mycinamicin II) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ๒.๓ การดื้อยาของจุลินทรีย์

การดื้อยา เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์จะทนทานต่อสภาพแวดล้อมใหม่เนื่องจากมีปัจจัยบางอย่างในตัวจุลินทรีย์เองหรืออาจเกิดขึ้นภายหลัง (ปรีชาและนงลักษณ์, ๒๕๔๘) เช่น การดื้อยาเพนิซิลิน อาจเกิดจากการผลิตเอนไซม์เพนิซิลินเนส (penicillinase) โดยจุลินทรีย์พวกที่มีความทนทานอยู่แล้วเปลี่ยนเพนิซิลินให้กลายเป็นกรดเพนิซิลโลอิก (penicilloic acid) ซึ่งไม่เป็นอันตราย หรือในอีกทางหนึ่งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งปกติอ่อนไหวต่อเพนิซิลินแต่ต่อมาอาจปรับตัวทนทานต่อเพนิซิลินขึ้นมาได้ ความทนทานที่เกิดขึ้นนี้เกิดขึ้นโดยพันธุ์กรรม ซึ่งทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับปรุงตัวสร้างเอนไซม์เพนิซิลินเนสได้ ในประชากรเซลล์แบคทีเรียที่อ่อนไหวต่อเพนิซิลินอาจจะมีเซลล์หนึ่งในร้อยล้านเซลล์เป็นเซลล์ผ่าเหล่าซึ่งทนทานต่อเพนิซิลิน ปกติสัดส่วนจำนวนระหว่างจุลินทรีย์พวกที่อ่อนไหวกับพวกที่ทนทานในประชากรหนึ่งมักถูกรักษาไว้ให้คงที่ เมื่อมีเพนิซิลินปรากฏอยู่พวกที่อ่อนไหวจะไม่มีการสืบพันธุ์เจริญเติบโต แต่พวกผ่าเหล่าซึ่งทนทานจะยังสามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ แล้วท้ายที่สุดจะกลายเป็นประชากรส่วนใหญ่ (สุพจน์, ๒๕๔๕)

### ๒.๓.๑ การถ่ายทอดการดื้อยา

เมื่อมีการใช้ยารักษาโรคและสารปฏิชีวนะในครั้งแรกๆ การดื้อยาของแบคทีเรียยังไม่เกิดขึ้น แต่เมื่อมีการใช้สารปฏิชีวนะแพร่หลายออกไป แบคทีเรียที่ไวต่อตัวยาจะถูกกำจัดหมดไป เหลือแต่เชื้อที่ดื้อยาเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ (ปรีชาและนงลักษณ์, ๒๕๔๘)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าปัจจัยความทนทานหรืออาแฟคเตอร์ (R factor) นั้นมีอยู่ในพลาสมิด (plasmid) ซึ่งเป็นชิ้นโครโมโซมส่วนเกินขนาดเล็กที่สามารถจำลองตัวเองได้ (สุพจน์, ๒๕๔๕) แต่ยีนดื้อยาบางชนิดก็อยู่ที่ส่วนของทรานโพซอน (transposons) ของดีเอ็นเอซึ่งอาจอยู่ที่โครโมโซมหรือพลาสมิดก็ได้ โดยยีนที่ดื้อยาจะถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวอื่นโดยวิธีคอนจูเกชัน (conjugation) (รัตนาภรณ์, ๒๕๔๘)

## ๒.๔ ชีววิทยาของเชื้อที่นำมาทดสอบ

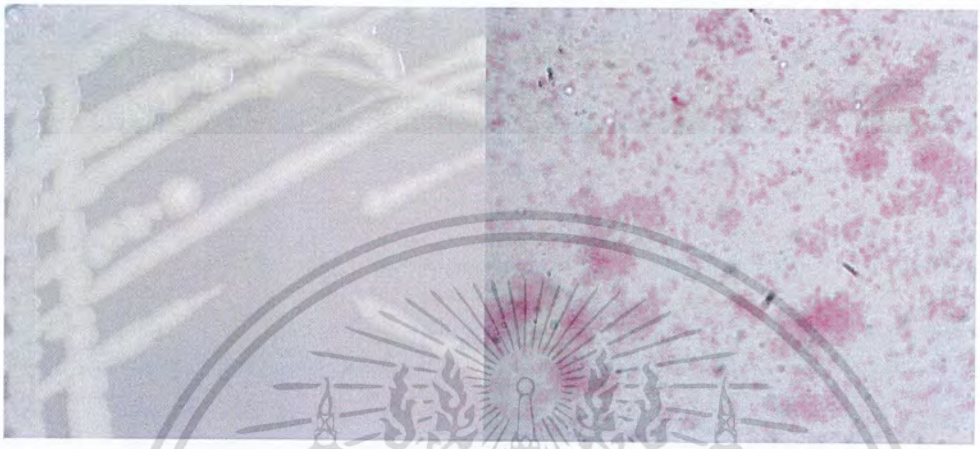
### ๒.๔.๑ เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)

#### ๒.๔.๑.๑ คุณสมบัติและการเจริญของเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)

เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) เป็นแบคทีเรียทรงแท่ง ขนาดกว้าง ๐.๔-๐.๗ ไมโครเมตร ยาว ๒-๔ ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมลบ (ภาพที่ ๓ ข) เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงธรรมดา เจริญได้ดีในภาวะไม่มีออกซิเจน แต่ในภาวะที่มีออกซิเจนก็สามารถเจริญได้ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนไหวได้เพราะมีขนรอบตัว (จิราพร, ๒๕๔๕) บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ ๒-๓ มิลลิเมตรในเวลา ๑๘ ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น แมกคอนกีเอกา (mac conkey agar) โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากการหมักแลกโทส หรือเลี้ยงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีโอซิน เมทิลีนบลู เอกา (eosin methylene blue agar) โคโลนีจะเป็นมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่หมักแลกโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือดบางสายพันธุ์มีการสลายเม็ดเลือดแดงแบบบีต้าฮีโมไลซีส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (๑๕-๔๕ องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อนได้ถึง ๖๐ องศาเซลเซียส ๑๕ นาที หรือ ๕๕ องศาเซลเซียส ๖๐ นาที (รัตนาภรณ์ และคณะ, ๒๕๕๑)



(ก) (ข)

**รูปที่ ๓** (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichia coli* ATCC 25922) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar)

(ข) ลักษณะเซลล์ของเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยายหนึ่งพันเท่า

**๒.๔.๑.๒ การก่อให้เกิดโรคของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)**

เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) มีระยะฟักตัว ๑๒-๗๒ ชั่วโมง การติดต่อที่สำคัญ คือ อาหาร น้ำปนเปื้อนอุจจาระเพราะปกติเชื้อนี้จะอยู่ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ ถ้าออกมาอยู่นอกลำไส้จะทำให้เกิดโรคได้หลายอย่างนอกจากอาการท้องร่วงแล้ว ยังทำให้เกิดการติดต่อเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ ในผู้หญิงพบว่าปากช่องคลอดจะมี เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) อยู่มาก เชื่อว่าสามารถเล็ดลอดเข้าไปในท่อปัสสาวะได้ ถ้าเชื้อแพร่เข้าสู่ระบบกระแสโลหิตก็สามารถทำให้เกิดโรคในอวัยวะอื่นๆได้ เช่น ปอดอักเสบ ฝีในตับ ถุงน้ำดีอักเสบ เป็นต้น โรคนี้รักษาด้วยยา นีโอมัยซิน (neomycin) หรือ โคลิสทิน (colistin) (จิราพร, ๒๕๔๕)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

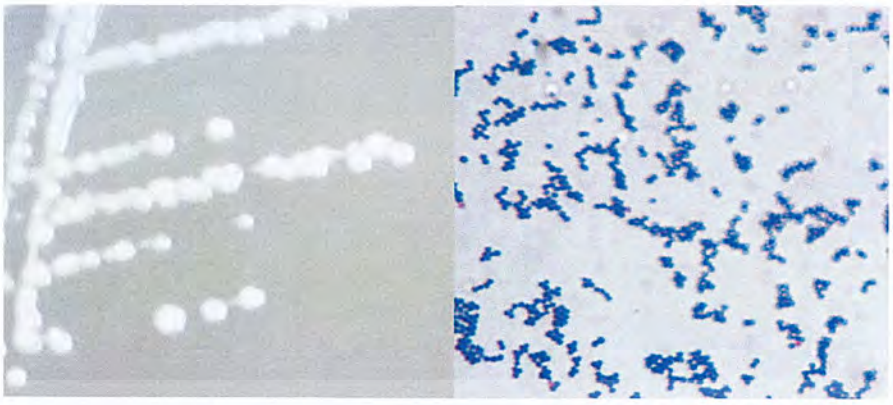
**๒.๔.๒ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)** (เฟื่องฟ้า, ๒๕๔๑)

**๒.๔.๒.๑ คุณสมบัติและการเจริญของสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)**

สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) คือ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) แต่เจริญได้ดีกว่าในที่มีออกซิเจน เชื้อจะเจริญได้ช่วงอุณหภูมิ ๑๐ ถึง ๔๕ องศาเซลเซียส และดีที่สุด ๓๗ องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่พีเอช ๔.๕ ถึง ๙.๓ แต่ดีที่สุดที่พีเอช ๗ ถึง ๗.๕ ลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ เป็นเงา ขนาดประมาณ ๑ ถึง ๔ มิลลิเมตร สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองที่เรียกว่า ไตรเทอพีนอย แคโรทีนอย (triterpenoid carotenoids) ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเหลืองทอง (รูปที่ ๔ ก) ซึ่งเชื้อได้ตามลักษณะโคโลนี การสร้างรงควัตถุของเชื้อนี้จะเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (๒๐-๒๕ องศาเซลเซียส) ต่อไปอีก ๒๔-๔๘ ชั่วโมง แต่เชื้อจะไม่สร้างรงควัตถุในที่ไม่มีออกซิเจนหรือในอาหารเหลว (broth) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลือด (blood agar) จะเห็นโซนการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมีลักษณะใส (β-hemolytic zone) รอบๆ โคโลนี และถ้าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลได้จะมีโคโลนีเหนียวเยิ้ม

สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สามารถย่อยน้ำตาลได้หลายชนิด โดยจะย่อยได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจน (respiration) และการหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจน (fermentation) ผลผลิตของการหมักย่อยน้ำตาลจะได้กรดแลกติก แต่ไม่ให้ก๊าซ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) จะทนความแห้งและความร้อนได้ดี (๕๐ องศาเซลเซียส ๓๐ นาที) นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (ร้อยละ๑๕ โซเดียมคลอไรด์) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียทั่วๆไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

**รูปที่ ๔** (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) บนอาหารบนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar)

(ข) ลักษณะเซลล์ของสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยายหนึ่งพันเท่า

**๒.๔.๒.๒ การก่อให้เกิดโรคของสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส** (*Staphylococcus aureus*)

ปกติเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) คือ อยู่ในร่างกายโดยไม่ทำให้เกิดโรค ชนิดที่ทำให้เกิดโรคพบบ่อย คือ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) โดยสามารถทำให้เกิดโรคได้ทุกส่วนของร่างกาย ได้แก่ การติดเชื้อเฉพาะที่ และการเกิดโรคทั่วร่างกาย

การติดเชื้อเฉพาะที่มักพบบริเวณผิวหนังซึ่งทำให้เกิดฝีฝักบัว แผลเป็นหนองต่างๆ หากติดเชื้อบริเวณทางเดินหายใจทำให้เกิดโรคไซนัสอักเสบ คออักเสบ หลอดลมอักเสบ ปอดบวม เป็นต้น

การเกิดโรคทั่วร่างกายสามารถเกิดโดยเชื้อลุกลามเข้าไปในร่างกายเข้าสู่อวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น ตับ ไต ปอด เนื้อสมอง หัวใจ และถ้าเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตกระจายทั่วตัว เรียกว่า แบคเทอริเมีย (bacteremia) หรือ เซปติซิเมีย (septicemia) มีอาการในหลายๆระบบ (toxic shock syndrome) คือ กลุ่มอาการมีไข้สูง หนาวสั่น อาเจียน ท้องเดิน บางรายอาจมีอาการเจ็บคอ ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ช็อค ไตวาย และอาจถึงแก่กรรม (จิราพร, ๒๕๔๕)

**๒.๔.๓ บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*)**

**๒.๔.๓.๑ คุณสมบัติและการเจริญของบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*)**

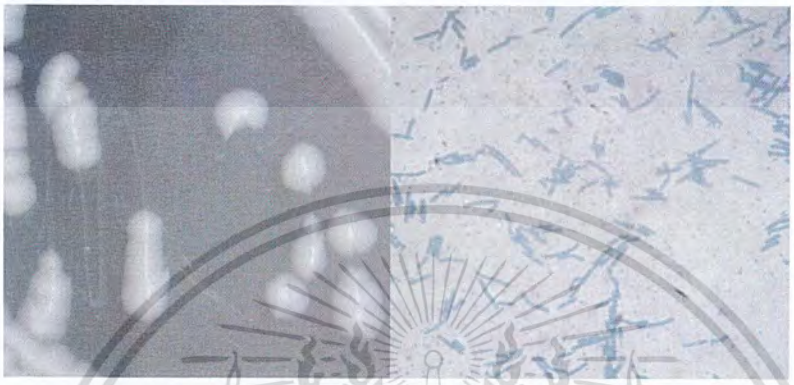
บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก หายใจโดยใช้ออกซิเจน มีลักษณะเซลล์เป็นแท่ง ที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานมาก (รูปที่ ๕ ข) ที่จะเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลชีพอื่นได้ มีโครงสร้างที่เป็นส่วนที่สะท้อนแสงสูงอยู่ตรงบริเวณเซลล์และเอ็นโดสปอร์ มีการจัดเรียงตัวทั้งแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเส้นสาย (chains) หรือเป็นเซลล์เดี่ยวๆซึ่งลักษณะของโคโลนีของ บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) จะเป็นแบบทึบแสงและด้าน อาจมีลักษณะเหี่ยวย่น (wrinkled) มีสีครีมจนถึงน้ำตาล

**๒.๔.๓.๒ การก่อให้เกิดโรค**

เชื้อบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) จะสามารถก่อโรคปอดบวมชนิดรุนแรงการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคลิ้นหัวใจอักเสบ การติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัด และโรคท้องร่วง



(ก) (ข)

**รูปที่ ๕** (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar)

(ข) ลักษณะเซลล์ของบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายหนึ่งพันเท่า

**๒.๔.๔ ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)**

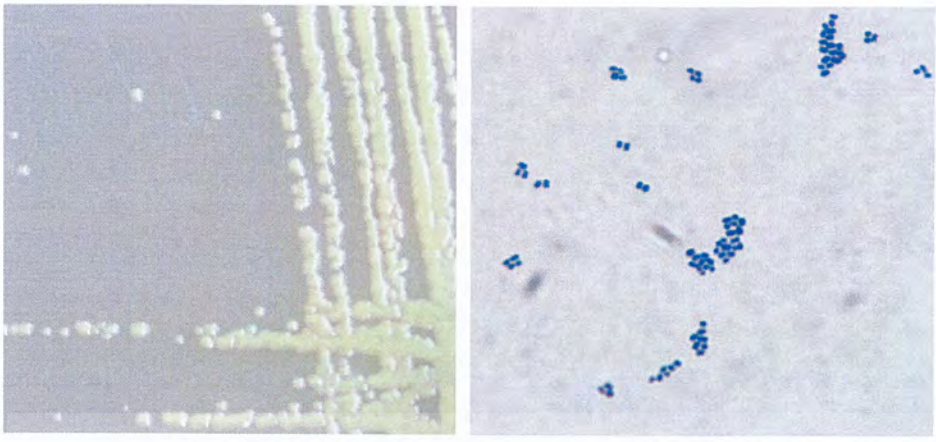
**๒.๔.๔.๑ คุณสมบัติและการเจริญของไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)**

ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มส่วนใหญ่พบอยู่เป็นกลุ่ม ๔ เซลล์ (ภาพที่ ๖ ข) มีความต้องการอากาศในการเจริญอย่างมาก (obligate aerobe) มีความไวต่อเบซิเตรซิน (basitracin) ในการทดสอบโคแอกกลูเลส (coagulase test) ให้ผลเป็นลบ ลักษณะโคโลนีมีสีเหลืองบนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar) (ภาพที่ ๖ ก) โดยทั่วไปมักพบเชื้อชนิดนี้ได้ในดิน ฝุ่น น้ำ และอากาศ และเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นบนผิวหนังของมนุษย์
( http://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus)

**๒.๔.๔.๒ การก่อให้เกิดโรคของไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)**

การก่อโรคในคนพบได้น้อย ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและสัมพันธ์กับการใส่อุปกรณ์การแพทย์เข้าสู่ร่างกายสามารถก่อโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท และการติดเชื้อในกระแสเลือด (ภัทรชัย, ๒๕๕๒)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

**รูปที่ ๖** (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar)

(ข) ลักษณะการเรียงตัวแบบกลุ่มสี่เซลล์ (tetrad) ของไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)

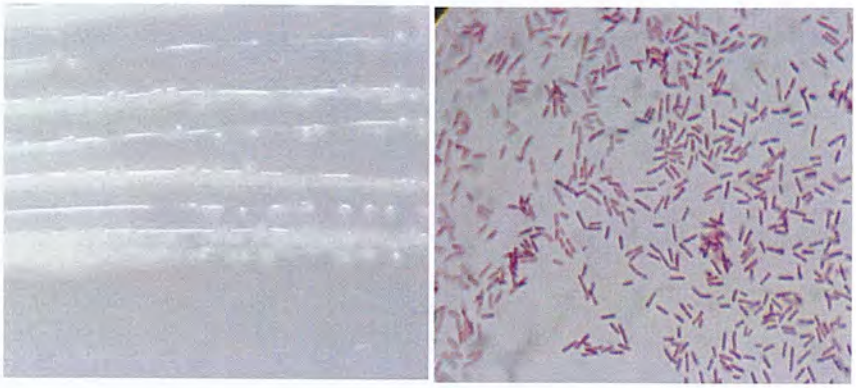
**๒.๔.๕ สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*)**

**๒.๔.๕.๑ คุณสมบัติและการเจริญของสูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*)**

สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง(ภาพที่ ๗ ข) มีขนาดประมาณ ๐.๕-๑ × ๑.๕-๕ ไมครอน มักพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออาจอยู่เป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ เชื้อเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่ส่วนปลายเซลล์ ๑ เส้น (polar monotrichous flagella) บางสปีชีส์อาจมีมากกว่า ๑ เส้น จัดอยู่ในกลุ่มต้องการอากาศอย่างแท้จริง (obligate aerobe) แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซออกซิเจนหากมีไนเตรทหรืออาร์จินีนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนในกระบวนการหายใจ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง ๓๐-๓๗ องศาเซลเซียส เชื้อสูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง ๔๒ องศาเซลเซียส และให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดส (oxidase test) บางสปีชีส์สามารถสร้างเม็ดสี เชื้อสูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) สามารถสร้างเม็ดสี ๔ ชนิด ที่พบได้บ่อย คือ ไพโอไซยานินหรือฟีนาซีน (สีเขียวน้ำเงิน) และไพโอเวอร์ดินหรือฟลูออเรสซีน (สีเหลืองสะท้อนแสง) ซึ่งทำให้หนองที่เกิดจากการติดเชื้อมีสีเหลืองเขียว ส่วนเม็ดสีชนิดอื่นที่พบได้ในบางสายพันธุ์คือ ไพโอเมลานิน (สีน้ำตาลดำ) และ ไพโอรูบิน (สีแดง) (ภัทรชัย, ๒๕๕๒)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ ๗** (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของสูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) บนอาหารทริปติกซอยเอกา (tryptic soy agar)

(ข) ลักษณะเซลล์ของสูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายหนึ่งพันเท่า

**๒.๔.๖ แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*)**

**๒.๔.๖.๑ ลักษณะทั่วไปของแคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*)**

แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) เป็นพวกยีสต์ชนิดหนึ่ง มีรูปร่างทั้งในรูปยีสต์ (yeast form) และ รูปเส้นใย (mycelial form) แล้วแต่ระยะเวลาของการเจริญเติบโต อาหาร และภาวะแวดล้อม เมื่อเจริญเติบโตบน ซาโบรอด เดกโตรส เอกา (sabouraud's dextose agar) ที่ ๒๕ องศาเซลเซียส ในเวลา ๓ วัน รูปร่างเซลล์ของยีสต์กลมหรือรูปไข่ ขนาด ๕ ถึง ๗ ไมโครเมตร บางชนิดค่อนข้างยาว เพิ่มจำนวนด้วยการสร้างบลาสโตโคนิเดีย (blastoconidia) ถ้าเลี้ยงบน คอร์นมีล เอกา (cornmeal agar) ที่อุณหภูมิห้องและเวลาเดียวกันมีรูปร่างเป็นเส้นใย และ เส้นใยเทียม (pseudomycelium) ตรงส่วนปลายมักสร้างคลามัยโดโคนิเดีย (chlamydoconidia) รูปร่างกลมผนังหนา ขนาด 8-12 ไมโครเมตร สร้าง บลาสโตโคนิเดียจากไฮฟี (hyphae) หรือสูโดไฮฟี (pseudohyphae) ตรงบริเวณที่มีผนังกั้นเซลล์ และถ้าอยู่ในสภาวะที่มีอากาศน้อย ภายใต้แผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip) จะสามารถสร้างเส้นใย (mycelium) และคลาไมโดโคนิเดีย (chlamydoconidia) ได้เร็วขึ้น ยิ่งกว่านั้นถ้าเติมเชื้อลงไปในซีรัม (serum) หรือไข่ขาวเก็บไว้ในอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง เซลล์ของยีสต์จะเริ่มงอกไฮฟา เป็นหลอดสั้นๆที่เรียกว่าเจิร์มทิวป์ (germ tube)

ตามปกติแคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) จะเจริญเติบโตเป็นยีสต์ที่มีผนังบาง ไม่มีแคปซูล มีขนาดประมาณ ๑.๕ ถึง ๔ ไมโครเมตร และแบ่งตัวโดยการแตกหน่อ (budding) อาจสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) โดยหน่อมาจับติดกันและยาวออกเป็นเส้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ ๓
# วิธีดำเนินการวิจัย

## ๓.๑ อุปกรณ์

๓.๑.๑ เครื่องแก้วต่างๆ

๓.๑.๒ ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

๓.๑.๓ ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

๓.๑.๔ ปากคีบ (forcep)

๓.๑.๕ ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

๓.๑.๖ ไม้พันสำลี

๓.๑.๗ ทิป (tips)

๓.๑.๘ กระดาษกรองวอทแมนเบอร์๑ (whatman no.1)

๓.๑.๙ แผ่นทดสอบ (paper disc: macherey-nagael ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๖ มิลลิเมตร)

๓.๑.๑๐ แผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (silica gel $GF_{254}$ TLC)

๓.๑.๑๑ คอลัมน์แก้ว (glass column)

## ๓.๒ เครื่องมือ

๓.๒.๑ เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker:บริษัท ไทยโพลีเมดิค จำกัด, gallenkamp)

๓.๒.๒ เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter: eutech, pH150)

๓.๒.๓ หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave: HIRAYAMA, HA-300MIV)

๓.๒.๔ ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow: บริษัท ซายน์เทค จำกัด, ABS1200)

๓.๒.๕ เครื่องชั่ง ๔ ตำแหน่ง (SARTORIUS, A200S)

๓.๒.๖ เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator: บริษัท แล็บโฟกัสจำกัด , LABOROTA 4001)

๓.๒.๗ ตู้บ่มเชื้อ (incubator: MEMMERT, BE600)

๓.๒.๘ ตู้อบลมร้อน (hot air oven: WTC BINDER, FD53)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


## ๓.๓ สารเคมี

๓.๓.๑ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

๓.๓.๒ สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)

๓.๓.๓ น้ำตาลกลูโคส (glucose)

๓.๓.๔ วุ้น (agar)

๓.๓.๕ ซาโบรอด เดกโตรส เอกา (Sabouraud's Dextrose Agar; SDA)

๓.๓.๖ ทริปติกซอย่เอกา (Tryptic Soy agar; TSA)

๓.๓.๗ เอทิลอะซีเตต (Ethylacetate; $C_4H_8O_2$)

๓.๓.๘ เมทานอล (methanol; $CH_3OH$)

๓.๓.๙ โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)

๓.๓.๑๐ เจลาติน (gelatin powder)

๓.๓.๑๑ แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch)

๓.๓.๑๒ น้ำทะเลเทียม (artificial sea water)

## ๓.๔ วิธีการทดลอง

### ๓.๔.๑ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินบนบกจำนวน ๕ ไอโซเลต ได้แก่ เอสเอ็ม๙-๓ อาร์บี๓-๑ เอ็นอาร์๑-๑๓ เอสเอ็ม๗-๖ เอสเอ็ม๕-๑และเชื้อแอคติโนมัยสีททางทะเลจำนวน ๙ ไอโซเลต ได้แก่ เอส๗เอฟ-๒๕ เอส๗เอฟ-๐๔ เอส๗เอฟ-๐๖ เอสที๐๔-๐๕ เอสที๐๑-๐๔ เอสพี๒๐๘-๐๑ เอสพี๒๐๖-๐๘ พีเอ็น๑-๑ และเอสเอ็ม๗-๓

### ๓.๔.๒ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีท

#### ๓.๔.๒.๑ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (morphological and cultural characteristics)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ในโครงการสเตรปโต-มัยซิสนานาชาติ (international *Streptomyces* project, ISP) ชนิดต่างๆ โดยวิธีขีดเชื้อบนจานอาหาร (cross streak) (Shiring และ Gottlied, ๑๙๖๖) ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อ และสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (IBC-NBS carotenoid color chart) (Mundie และ David, ๑๙๕๐) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเลนส์ทำงานระยะไกล (long working distance lens)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117233

**๓.๔.๒.๒ การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ**

ในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนใช้อาหารพื้นฐาน (basal medium agar) (shirling และ Gottlieb, ๑๙๖๖) ที่เติมโบรโมคลีซอลเพอร์เพิล(bromo cresol purple) ที่ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๐๐๔ เป็นตัวชี้บ่ง (indicator) จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ ๑ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๑๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| ไม่มีแหล่งคาร์บอน | ดี-ไรโบส |
| ดี-ไซโลส | อินโนซิทอล |
| ดี-แมนนิทอล | กลีเซอรอล |
| แอล-แรมโนส | ซาลิซิน |
| ราฟฟิโนส | ดี-กาแลคโตส |
| เซลโลไบโอส | แลคโตส |
| แอล-อะราบิโนส | ดี-ฟลุคโตส |
| ซูโครส | กลูโคส |

ทำการทดสอบโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ โดยเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘๕ ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์มาหยดลงบนอาหารที่ใช้ทดสอบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๗ ถึง ๑๔ วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดตรวจผลโดยเปรียบเทียบลักษณะสีที่เปลี่ยนไปของตัวชี้บ่ง (indicator) ในอาหาร

การอ่านผลทดสอบ

(+) คือมีการผลิตกรดเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดนั้น สีของตัวบ่งชี้ (indicator) ในอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีน้ำเหลืองถึงน้ำตาลอ่อน

(-)ไม่มีการผลิตกรดเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดนั้น อาหารจะเป็นสีน้ำเงิน

**๓.๔.๒.๓ การย่อยสลายแป้ง (starch hydrolysis)**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารวุ้นเกลืออนินทรีย์-แป้ง (inorganic salt-strach agar, ISP4) ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลโดยการหยดสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเห็นบริเวณใสรอบๆ โคโลนีที่เชื้อขึ้นแต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเห็นเป็นสีน้ำเงินรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๓.๔.๒.๔ การแข็งและย่อยสลายโปรตีนนม (coagulation and peptonization)**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในน้ำนม (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ ๑๐ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นพบว่าจากเดิมที่มีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นขาวใส ถ้ามีการตกตะกอนจะเกิดการจับตัวของโปรตีนในนมเป็นก้อนแข็งในหลอด

**๓.๔.๒.๕ การย่อยสลายเจลาติน (gelatin liquefaction)**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวเจลาติน (bouillon gelatin broth) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลโดยนำหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อไว้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที จากนั้นเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อถ้าเชื้อมีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

**๓.๔.๒.๖ การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction)**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวเปปโตนไนเตรท (peptone nitrate broth) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลโดยเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ๒ หยด และสารละลายเอ็นเอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนพทิลลามีน (N, N-dimethyl-L-naphthylamine) ๓ หยด ถ้าเชื้อมีการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรต์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงส้ม

**๓.๔.๒.๗ การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๑.๕ ๒ ๓ ๔ ๕ ๖ และ ๗ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อในอาหาร

**๓.๔.๒.๘ การเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) ที่ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ ๔ ๔.๕ ๕ ๖ ๘ และ ๙ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๔๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลการเจริญที่ระดับพีเอชต่างๆ

**๓.๔.๒.๙ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหารไอเอสพี ๒ (ISP2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๒๐ ๓๐ ๓๗ ๔๕ ๕๐ ๕๕ และ ๖๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๔ วัน ตรวจผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๓.๔.๓ การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion)**

**๓.๔.๓.๑ การเพาะเลี้ยงเชื้อ**

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวยีสต์สกัดมอลต์สกัด (yeast extract malt extract broth หรือ ISP2 broth) ปริมาตร ๑๐๐ มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๑๔ วัน (สำหรับเชื้อแอคติโนมัยสีททางทะเลจะใช้น้ำทะเลเทียม (ภาคผนวก ก) แทนน้ำกลั่น)

**๓.๔.๓.๒ การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ**

เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micococcus luteus* ATCC 9341) เอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichia coli* ATCC 25922) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และ แคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘๕ ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน (McFarland) เบอร์ ๐.๕ (เทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่น (O.D.) ให้มีค่าอยู่ในช่วง ๐.๐๘ ถึง ๐.๑เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น ๖๒๕ นาโนเมตร) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ ๑×๑๐$^{๕}$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

**๓.๔.๓.๓ การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ**

เตรียมอาหารมิวเลอร์ฮินตันเอกา (mueller's hinton agar) และ/หรือ ทริปติกซอยเอกา (tryptic Soy agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและซาโบรอดส์เดกโตรสเอกา (sabouraud's dextrose Agar) สำหรับเลี้ยงยีสต์ ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ๑๕ นาที จากนั้นดูดอาหารปริมาตร ๒๐ มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๙๐ มิลลิเมตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่ว ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

**๓.๔.๓.๔ การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion)**

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายในข้อ ๓.๔.๓.๒ แล้วทา (swab) ให้ทั่วอาหารที่จะใช้ทดสอบรอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารด้วยแท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๖ มิลลิเมตร และดูดน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทปริมาตร ๓๐ ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและ ๓๐ องศาเซลเซียส ๔๘ ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นในหน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดมา ๑ ไอโซเลต มาเลี้ยงในปริมาณมาก

**๓.๔.๔ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในปริมาณมาก**

**๓.๔.๔.๑ การเตรียมหัวเชื้อ (seed medium)**

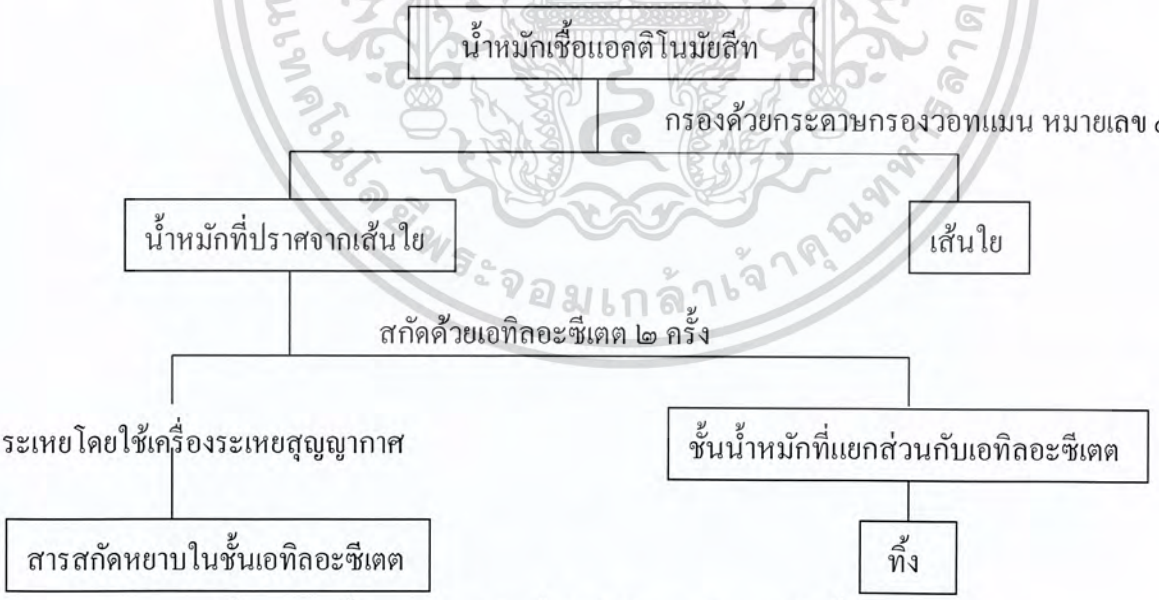
ทำการเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวนหนึ่งห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ถ่ายลงในอาหารเหลวยีสต์สกัดมอลต์สกัด (yeast extract malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๔ วัน

**๓.๔.๔.๒ การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ**

ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากหัวข้อ ๓.๔.๔.๑ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด ๕๐๐ มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวยีสต์สกัดมอลต์สกัดปราศจากเชื้อปริมาณ ๒๐๐ มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่าง (pH) ๗.๒ สำหรับเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากบกและความเป็นกรดด่าง (pH) ๗.๘ สำหรับเชื้อแอคติโนมัย-สีททางทะเล บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ ๒๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑๔ วัน

**๓.๔.๔.๓ การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีท**

นำน้ำหมักเชื้อจากข้อ ๓.๔.๔.๒ มาทำการสกัดโดยใช้เอทิลอะซีเตต ๒ ครั้ง จากนั้นนำมาระเหยในเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporater) จะทำให้ได้สารสกัดในชั้นเอทิลอะซีเตต ดังรูปที่ ๘




**รูปที่ ๘** แสดงขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต

ทำการคำนวณผลได้ของปริมาณสาร (yield) โดยใช้สูตร $\frac{\text{ปริมาณสารที่ได้ (กรัม)}}{\text{ปริมาณน้ำหมักเชื้อที่เลี้ยง (ลิตร)}} \times ๑๐๐$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**๓.๔.๕ การแยกสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี**

นำสารสกัดจากข้อ ๓.๔.๔.๓ มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เซฟาเด็กซ์แอลเอช ๒๐ (sephadex LH 20) เป็นเฟสคงที่และให้เมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ทำการบรรจุตัวเฟสคงที่ลงในคอลัมน์แก้วสำหรับแยกสารและปล่อยทิ้งให้คงตัว บรรจุสารสกัดหยาบที่ต้องการแยกแล้วทำการเก็บสารละลายที่ชะครั้งละ ๑๐ มิลลิลิตรหรือตามแถบสารที่แยกออกจากกัน จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วน (fraction) มาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง โดยใช้แผ่นทีแอลซี อะลูมิเนียม ซิลิกาเจล ๖๐ เอฟ$_{๒๕๔}$ (TLC aluminium silica gel 60 $F_{254}$) รวมส่วนที่แสดงรูปแบบบนแผ่นทีแอลซี ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำส่วนที่ได้รวมไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

**๓.๔.๖ การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography:TLC)**

ตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่ได้โดยละลายสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายสารสกัดหยาบได้หมด จุด (spot) สารละลายสารสกัดหยาบบนแผ่นทีแอลซี (aluminium sheet silica gel 60 $F_{254}$) รอให้แห้ง จากนั้นนำไปจุ่ม (develop) ลงในขวดฝาปิดที่มีระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมทำการตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่นทีแอลซี (TLC) โดยนำไปส่องใต้รังสียูวี ที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ และ ๓๖๕ นาโนเมตร และหาค่าอาร์เอฟ ($R_f$, retardation factor) ของสาร โดยสูตร

$$\text{อาร์เอฟ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกทำละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

**๓.๖.๗ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของส่วนที่แยกได้**

**๓.๖.๗.๑ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิคเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion)**

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (Lorian, ๑๙๘๐) โดยอาศัยหลักการแพร่ของสิ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ (disk) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของของสารสกัด เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๙๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) เอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichia coli* ATCC 25922) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และ แคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) โดยมีวิธีการ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทีเอสเอ (TSA) และ เอสดีเอ (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ๐.๘๕ เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลนเบอร์ ๐.๕ (McFarland no.0.5) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ ๑×๑๐$^{๕}$ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทา (swap) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายบนผิวอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ๕๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบ รอจนแห้งจากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทา เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไว้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐ สำหรับเชื้อยีสต์และ ๓๗ องศาเซลเซียสสำหรับแบคทีเรีย เป็นเวลา ๔๘ และ ๒๔ ชั่วโมง ตามลำดับ ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (inhibition zone)

**๓.๖.๗.๒ การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีไบโอออโทกราฟ (bioautographic method)**

นำสารแต่ละส่วนที่รวมได้มาผ่านกระบวนการของโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางซึ่งใช้แผ่นทีแอลซี อะลูมิเนียม ซิลิกาเจล ๖๐ เอฟ$_{๒๕๔}$ (TLC aluminium silica gel 60 $F_{254}$) บนแผ่นอลูมิเนียมเป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์คือเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนอัตราส่วน ๑ ต่อ ๔ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อจุ่ม (develop) แผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางแล้วให้ทิ้งไว้ให้แห้งเสมอกัน ตรวจสอบผลโดยนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ และ ๓๖๕ นาโนเมตร วงจุดที่ปรากฏด้วยดินสอติดขอบแต่ละด้านของแผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางให้ชิดกับบริเวณขอบของสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อของทีเอสเอ (TSA) และเอสดีเอ (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ตามลำดับที่ทา (swap) เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง ๖ ชนิดไว้แล้ว นำแผ่นทีแอลซีที่ได้ วางทาบลงบนผิวหน้าของจานอาหาร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรียและที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์สังเกตผลโดยดูวงใสที่เกิดขึ้นบริเวณจุด (spot) ต่างๆ รายงานผลเป็นค่าอาร์เอฟ ($R_f$) ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ ๔

# ผลการทดลอง

## ๔.๑ การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

### ๔.๑.๑ ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด ๑๔ ไอโซเลต ซึ่งแบ่งเป็น แอคติโนมัยสีททางบกจำนวน ๕ ไอโซเลตและทางทะเล ๙ ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาการเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้ผลดังนี้

เชื้อไอโซเลต เอสเอ็ม๕-๑ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเหลืองเข้ม (dark orange yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลชมพู (brownish pink) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเส้นตรง (รูปที่ ๘ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๔.๕-๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๓๗ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและแป้งได้ดี ย่อยสลายเจลาตินได้เล็กน้อย และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

**รูปที่ ๙** ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๕-๑

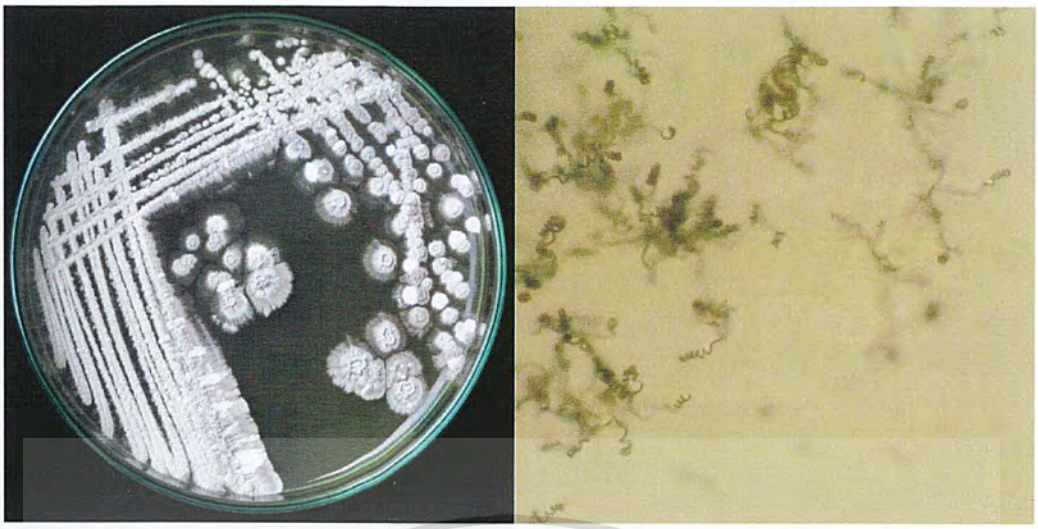
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต เอ็นอาร์๑-๑๓ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวเข้ม (dark greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอมเขียวเข้ม (dark greenish yellow) สร้างรงควัตถุสีเขียวอมเหลืองคล้ำ (very deep yellowish green) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ ๙ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕ ถึง ๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๕๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนนม เจลาติน และ แป้งได้ดี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

**รูปที่** ๑๐ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอ็นอาร์๑-๑๓

เชื้อไอโซเลต เอสเอ็ม๙-๓ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเทาชมพู (pinkish gray) สร้างเส้นใยอากาศน้ำตาลอ่อนเทา (light brownish gray) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ ๑๐ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕ ถึง ๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๓๗ องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและเจลาติน แต่สามารถย่อยแป้งได้ดี รวมทั้งสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสแตปฟีโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่** ๑๑ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๙-๓

เชื้อไอโซเลต อาร์บี๓-๑ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มส้มส่องแสง (brilliant orange) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างรงควัตถุสีส้มเข้ม (strong orange) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) ไม่ตรวจพบสปอร์เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ ๑๑ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๔ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕ ถึง ๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๔๐ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนนม เจลาตินและแป้งได้ดี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส(*Staphylococcus aureus*)

**ภาพที่** ๑๒ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต อาร์บี๓-๑

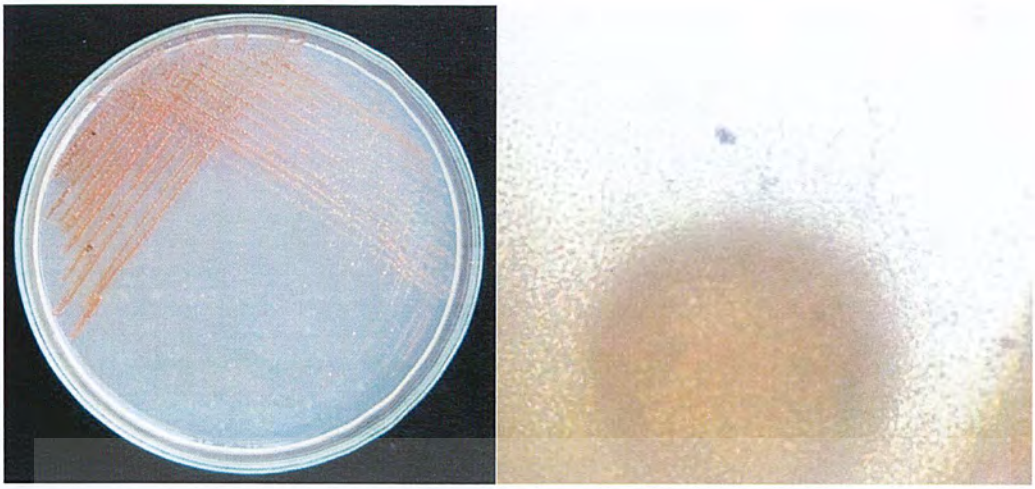
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๖ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมแดงแก่ (dark radish orange) สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูซีด (pale pink) สร้างรงควัตถุสีชมพูคล้ำ (deep pink) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์ม้วนเป็นเกลียวสั้น (รูปที่ ๑๒ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๔.๕-๘ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๓๗ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและแป้งได้ดี สามารถย่อยสลายเจลาตินได้บ้างแต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*)

**รูปที่** ๑๓ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๖

เชื้อไอโซเลต เอสที๐๔-๐๕ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้ม (strong brown) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร(รูปที่ ๑๓ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๒ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕-๘ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๓๗-๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งและเจลาตินได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis)*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่** ๑๔ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสที๐๔-๐๕

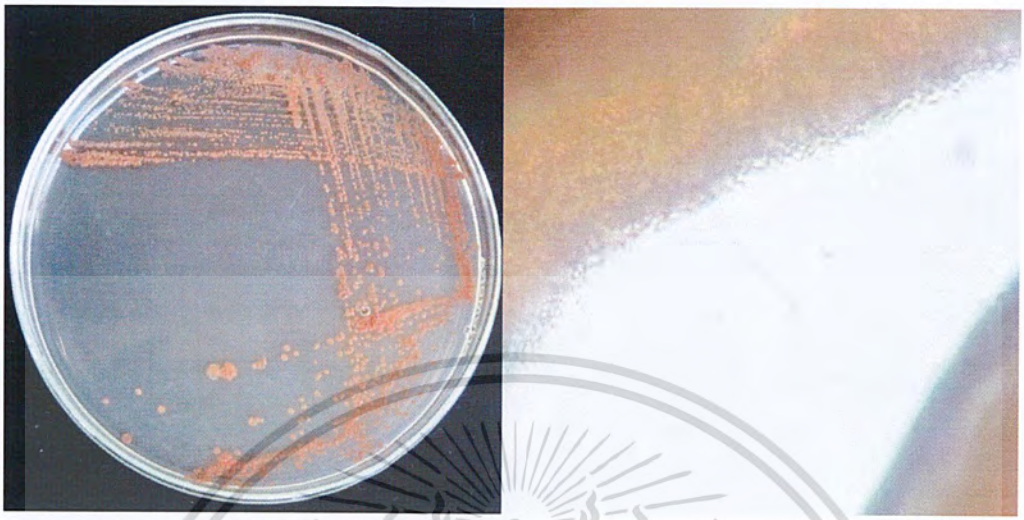
เชื้อไอโซเลต เอสพี๒๐๘-๐๑ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มคล้ำ (deep orange) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ ๑๔ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๒ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕-๙ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๓๗-๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งและเจลาตินได้ดี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

**รูปที่ ๑๕** ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสพี๒๐๘-๐๑

เชื้อไอโซเลต เอสพี๒๐๖-๐๘ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มสว่าง (vivid orange) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ ๑๕ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๒ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๕-๙ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๒๐-๔๐ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งและเจลาตินได้ดี ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนและไม่สามารถ

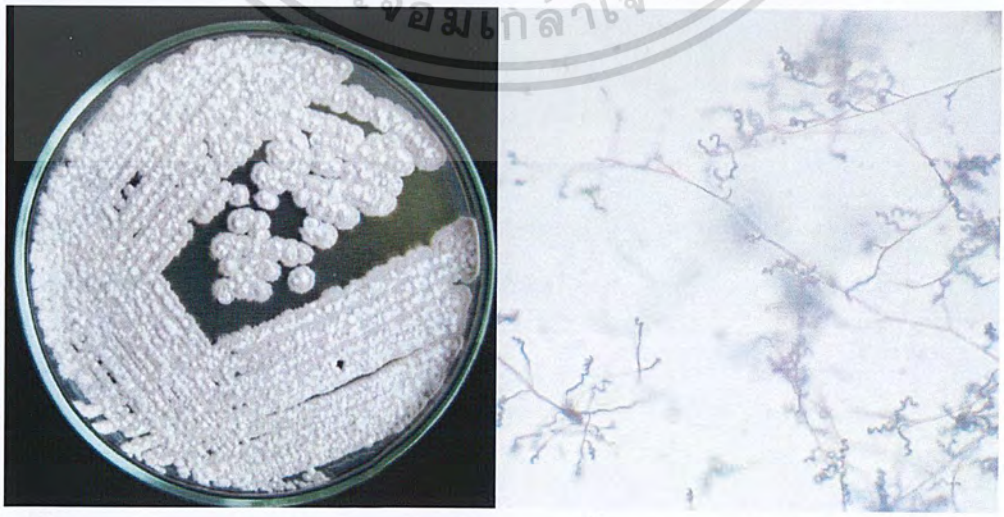
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ รวมทั้งไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



**รูปที่** ๑๖ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสพี๒๐๖-๐๘

เชื้อไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๔ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเขียวเข้มเหลือง (dark greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ ๑๖ ข) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๔.๕-๘ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งและเจลาตินได้ดี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ รวมทั้งไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



**รูปที่** ๑๖ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๖ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มสว่าง (light orange) สร้างเส้นใยอากาศสีเทาชมพู (pinkish gray) สร้างสปอร์ม้วนเป็นเกลียว (รูปที่ ๑๗ ข) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๕ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๔.๕-๘ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี ย่อยสลายเจลาตินได้บ้าง ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus)*

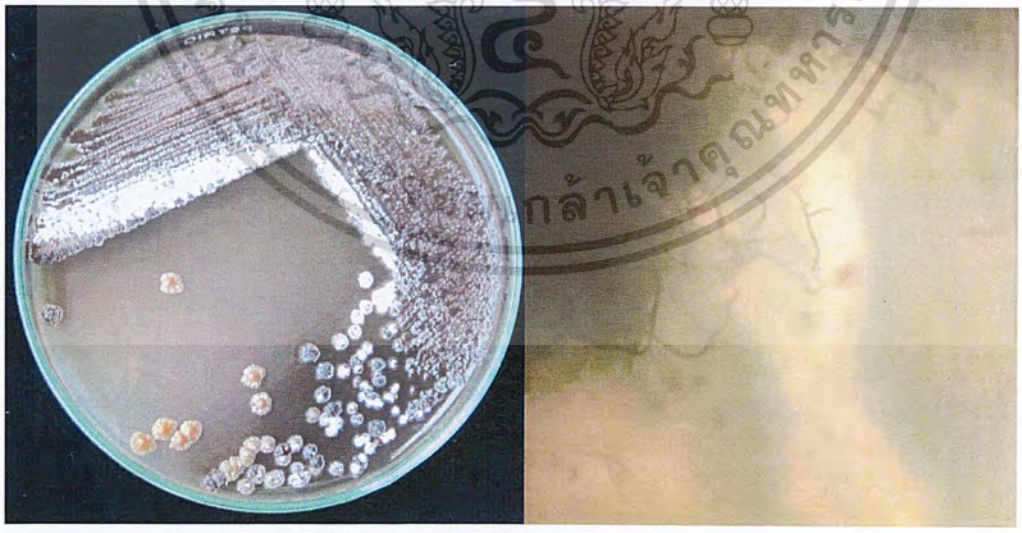
**รูปที่** ๑๘ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๖

เชื้อไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมแดงคล้ำ (deep raddish orange) สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียวมะกอก (grayish olive green) สร้างรงควัตถุสีส้มอมเทาแดง (grayish raddish orange) สปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียวสั้น (รูปที่ ๑๘ ข) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๕ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๖-๘ ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้คือ ๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี ย่อยสลายเจลาตินได้เล็กน้อย ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) และแคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ ๑๕** ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต พีเอ็น๑-๑

เชื้อไอโซเลต เอส๗เอฟ-๒๕เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลคล้ำ (deep brown) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลมะกอก0 (moderate olive brown) สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงแท่งสั้นๆ (รูปที่ ๑๕ ข) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๕ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๖-๘ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๔๕ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งและเจลาตินได้ดี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)



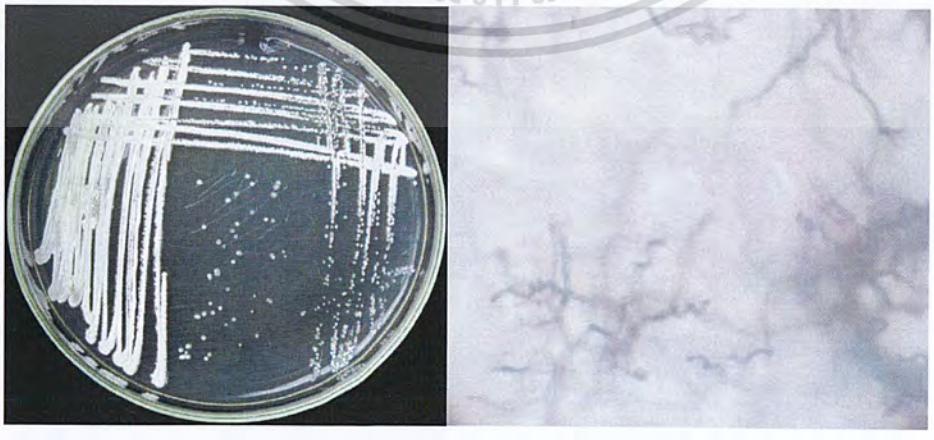
**รูปที่ ๒๐** ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอส๗เอฟ-๒๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๓ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลืองแก่ (strong yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมฟ้า (blueish gray) สร้างสปอร์เป็นสายยาวม้วนเป็นเกลียว (รูปที่ ๒๐ ข) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๔.๕-๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๔๐ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนแป้งและรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ดี ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

**รูปที่** ๒๑ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสเอ็ม๗-๓

เชื้อไอโซเลต เอสที๐๑-๐๔ เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเขียวอมเทาเหลือง (grayish yellowish green) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างสปอร์เป็นสายยาวม้วนเป็นเกลียว (รูปที่ ๒๑ ข) บนอาหารไอเอสพี๒ (ISP2) สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือสูงสุดร้อยละ ๗ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ ๖-๙ อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ ๔๐ องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีน แป้งเจลาตินและรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ดี ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



**รูปที่** ๒๒ ลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต เอสที๐๑-๐๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่๓ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทำการศึกษา**

| กลุ่ม | รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นเกลือ | | | | | | | ความเป็นกรดด่าง | | | | | | การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ | | | | | | โปรตีนในนม | | ย่อยสลายเจลาติน | รีดิวซ์ไนเตรท | ย่อยสลายแป้ง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ๑.๕ | ๒ | ๓ | ๔ | ๕ | ๖ | ๗ | ๔ | ๔.๕ | ๕ | ๖ | ๘ | ๙ | ๒๐ | ๓๗ | ๔๐ | ๔๕ | ๕๐ | ๕๕ | ย่อยสลายโปรตีน | ตกตะกอนโปรตีน | | | |
| ปก | เอ็นอาร์๑-๑๓ | + | + | + | + | + | + | + | - | - | w | + | + | + | + | + | + | w | - | - | + | - | + | - | + |
| | เอสเอ็ม๙-๓ | + | + | + | + | + | + | + | - | - | w | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | อาร์บี๓-๑ | + | + | + | + | + | + | + | - | - | w | + | + | + | + | + | + | - | - | - | w | + | + | - | + |
| | เอสเอ็ม๗-๖ | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | w | - | + |
| | เอสเอ็ม๕-๑ | + | + | + | + | + | + | + | - | + | w | w | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | w | w | + |
| ทะเล | เอสที๐๔-๐๕ | + | w | - | - | - | - | - | - | - | w | + | + | + | - | + | + | w | - | - | - | - | w | + | + |
| | เอสพี๒๐๘-๐๑ | w | w | - | - | - | - | - | - | - | w | + | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| | เอส๗เอฟ-๐๔ | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| | เอส๗เอฟ-๐๖ | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | w | - | + |
| | พีเอ็น๑-๑ | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | w | - | - | + | + | w | - | + |
| | เอส๗เอฟ-๒๕ | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | w | w | - | - | + | + | + | - | + |
| | เอสเอ็ม๗-๓ | + | + | + | + | + | + | + | - | w | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + |
| | เอสพี๒๐๖-๐๘ | + | + | - | - | - | - | - | - | - | w | w | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | + |
| | เอสที๐๑-๐๔ | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + |

**ตารางที่ ๔ การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตต่างๆ**

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์บอน | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ดี-แมนนิทอล | ดี-ไรโบส | แอล-แรมโนส | อินโนซิทอล | ดี-ราฟิโนส | กลีเซอรอล | มาลิโตส | แลคโตส | ดี-กาแลกโตส | แมโนเรออล | เซลโลไบโอส | ดี-ฟรุกโตส | ดี-ไซโรส | ซูโครส |
| เอสที๐๔-๐๕ | w | - | - | w | - | - | - | - | - | - | w | - | w | - |
| เอสพี๒๐๘-๐๑ | - | - | - | - | w | - | - | w | - | + | + | - | + | - |
| เอส๗เอฟ-๐๔ | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | - |
| เอส๗เอฟ-๐๖ | + | + | + | + | - | + | w | - | + | + | + | + | + | - |
| พีเอ็น๑-๑ | - | + | - | w | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - |
| เอส๗เอฟ-๒๕ | - | + | - | w | - | + | - | - | - | - | w | - | w | - |
| เอสเอ็ม๗-๓ | + | + | + | w | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| เอสพี๒๐๖-๐๘ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| เอสที๐๑-๐๔ | w | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - |

หมายเหตุ + = เกิดการเปลี่ยนสีตัวบ่งชี้ (indicator) จากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง

\- = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีตัวบ่งชี้ (indicator)

w = เกิดการเปลี่ยนสีตัวบ่งชี้ (indicator) เล็กน้อย

**ตารางที่ ๔(ต่อ) การผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตต่างๆ**

| รหัสเชื้อ | แหล่งคาร์บอน | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ดี-แมนนิทอล | ดี-ไรโบส | แอล-แรมโนส | อินโนซิทอล | ดี-รัฟฟิโนส | กลีเซอรอล | ซาลิซิน | แลคโตส | ดี-กาแลกโตส | แมนนิเรอะ-บอเท | เซลโลไบโอส | ดี-ฟรุกโตส | ดี-ไซโรส | ซูโครส |
| เอ็นอาร์๑-๑๓ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| เอสเอ็ม๙-๓ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | w |
| อาร์บี๓-๑ | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| เอสเอ็ม๗-๖ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| เอสเอ็ม๕-๑ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

หมายเหตุ + = เกิดการเปลี่ยนสีตัวบ่งชี้ (indicator) จากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง

\- = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีตัวบ่งชี้ (indicator)

w = เกิดการเปลี่ยนสีตัวบ่งชี้ (indicator) เล็กน้อย

## ๔.๒ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต

เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง ๑๔ ไอโซเลต โดยวิธีเอกาเวล-ดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) พบว่ามีเชื้อจำนวน ๗ ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบคือ ไอโซเลต เอสเอ็ม๘-๓ เอสที๐๔-๐๕ อาร์บี๓-๑ เอส๗เอฟ-๐๖ เอส๗เอฟ-๒๕ เอสเอ็ม๗-๖ และพีเอ็น๑-๑

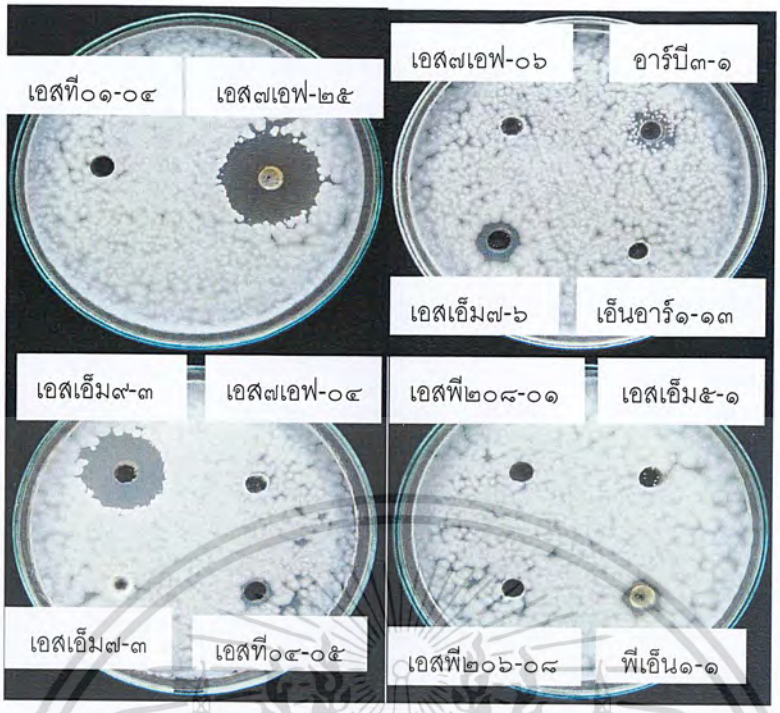
สารทุติยภูมิที่สร้างจากเชื้อไอโซเลต อาร์บี๓-๑ เอสที๐๔-๐๕ และเอส๗เอฟ-๐๖ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๑ ชนิด คือสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไอโซเลต เอสเอ็ม๘-๓ เอสเอ็ม๗-๖ และเอส๗เอฟ-๒๕ มีฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๓ ชนิดคือ คือสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) สำหรับเชื้อไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๔ ชนิดคือ คือสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) ไมโคร-คอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) และ แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) (ตารางที่ ๕) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเชื้อไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นจากการสกัดหยาบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่๕ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยวิธี เอกาเวลดิฟ ฟิว-ชัน (agar well diffusion)**

| ไอโซเลต | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) | บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) | ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) | แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) | เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichea coli*) | สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) |
| เอส๗เอฟ-๐๔ | - | - | - | - | - | - |
| เอสเอ็ม๘-๓ | ๒๒.๐ | ๒๕.๓ | ๒๘.๕ | - | - | - |
| เอสที๐๔-๐๕ | - | ๑๐.๕ | - | - | - | - |
| เอสเอ็ม๗-๓ | - | - | - | - | - | - |
| อาร์บี๓-๑ | ๘.๕ | - | - | - | - | - |
| เอส๗เอฟ-๐๖ | - | - | ๑๘.๐ | - | - | - |
| เอ็นอาร์๑-๑๓ | - | - | - | - | - | - |
| เอสเอ็ม๗-๖ | ๑๕.๘ | ๑๒.๘ | ๑๘.๘ | - | - | - |
| เอส๗เอฟ-๒๕ | ๒๕.๕ | ๒๗.๕ | ๓๒.๓ | - | - | - |
| เอสที๐๑-๐๔ | - | - | - | - | - | - |
| เอสเอ็ม๕-๑ | - | - | - | - | - | - |
| เอสพี๒๐๘-๐๑ | - | - | - | - | - | - |
| พีเอ็น๑-๑ | ๑๓.๕ | ๑๑.๐ | ๑๕.๓ | ๒๐.๕ | - | - |
| เอสพี๒๐๖-๐๘ | - | - | - | - | - | - |

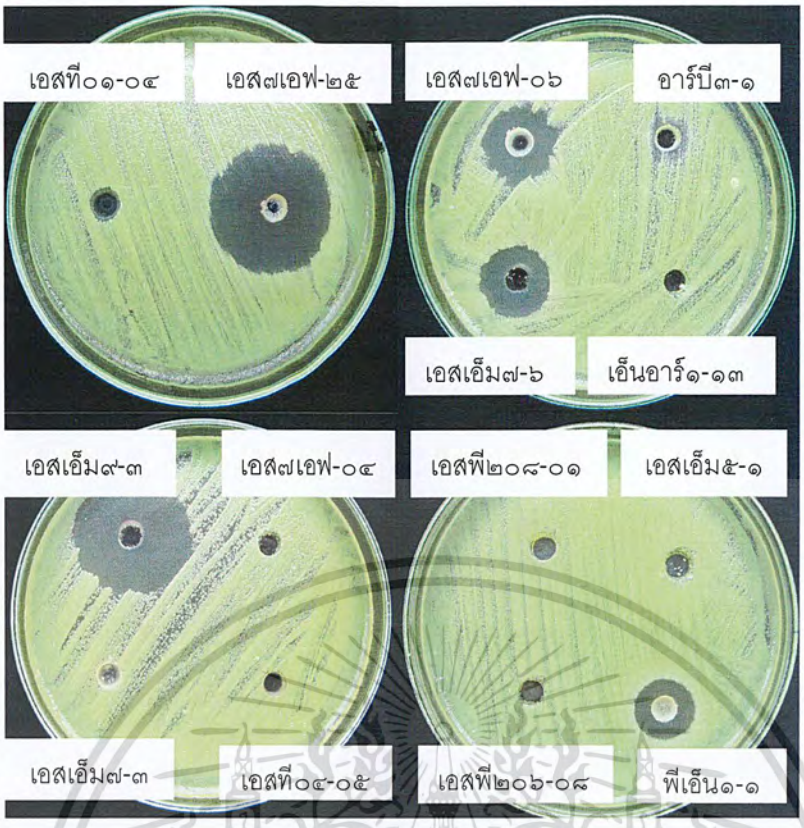
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



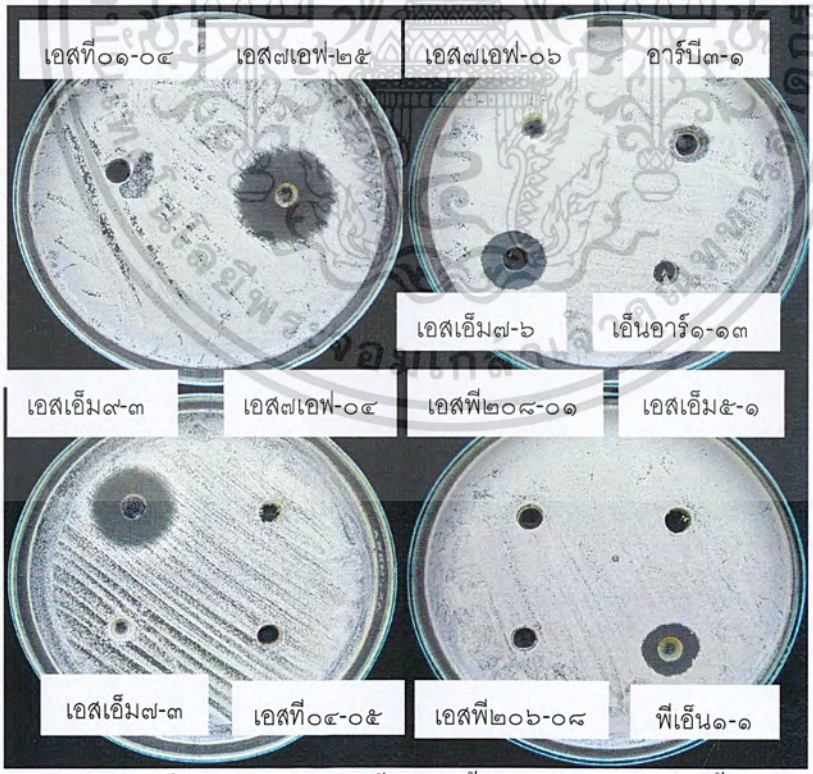

**รูปที่ ๒๓** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)

**รูปที่ ๒๔** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อแคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

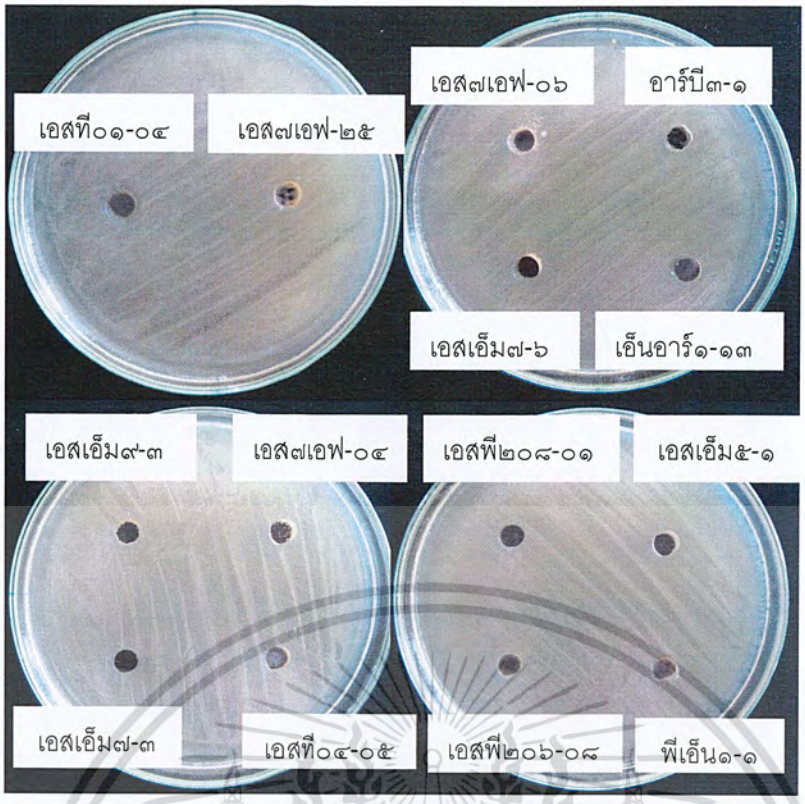



**รูปที่ ๒๕** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341)

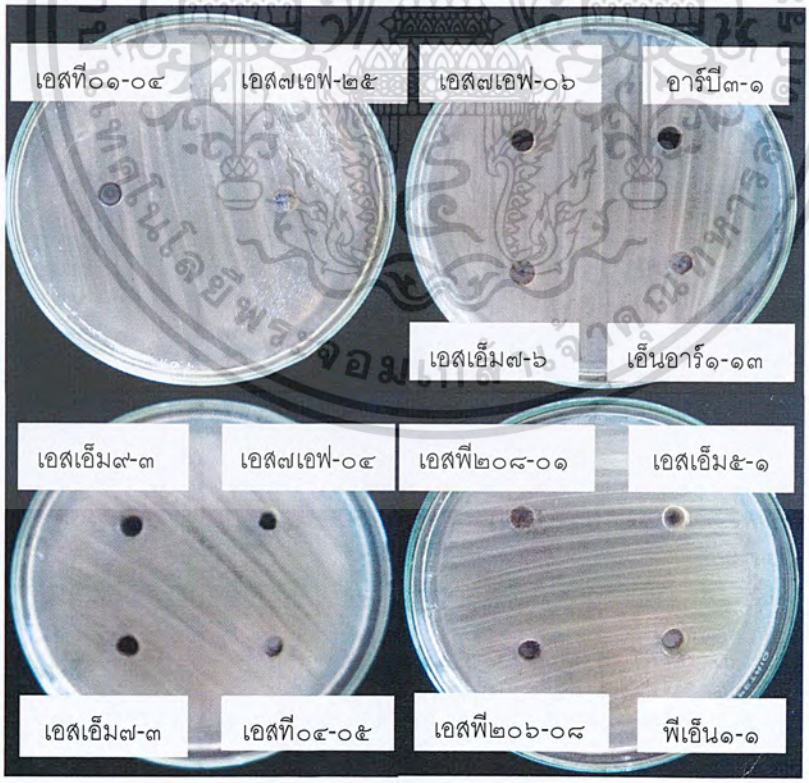



**รูปที่ ๒๖** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ๒๗** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เอทีซีซี ๒๕๙๒๒ (*Escherichia coli* ATCC 25922)




**รูปที่ ๒๘** การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อสูโดโมแนส แอรูจิโนซา เอทีซีซี ๒๗๘๕๓ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ๔.๓ การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในปริมาณมาก

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ มาเลี้ยงในอาหาร ยีสต์สกัด-มอลต์สกัดปริมาตร ๘ ลิตรเป็นเวลา ๑๔ วันที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว ๒๐๐ รอบต่อนาที นำส่วนของน้ำหมักมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ทำการระเหยภายใต้เครื่องระเหยสุญญากาศได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้นสีม่วงปริมาณ ๒๗๐ มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ ๓.๓๗

## ๔.๔ การแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาณ ๒๗๐ มิลลิกรัม มาแยกด้วยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโดยใช้เฟสคงที่คือ เซฟาเดกซ์ แอลเอช๒๐(Sephadex LH-20) และเฟสเคลื่อนที่คือเมทานอล สามารถแยกสารเป็นส่วน (fraction) ได้ทั้งหมด ๑๐๗ ส่วน นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบรูปแบบของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน ๘:๒ พบรูปแบบของสารที่คล้ายคลึงกัน ๕ รูปแบบ โดยองค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๑ (F1) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๑ ถึง ๑๒ ปริมาณ ๘.๒ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีส้มจำนวน ๒ แถบ ที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๐๔ และ ๐.๘ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสารสีดำบริเวณจุดเริ่มต้น (based line) เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร พบแถบสารสีส้มที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๐๔ และ ๐.๘

องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๒ (F2) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๑๓ – ๒๗ ปริมาณ ๑๙.๕ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีส้มที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๕ ๐.๗๔ และ ๐.๘๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสีส้มที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๒๒ ๐.๓๔ ๐.๕๘ และ ๐.๘๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร พบแถบสารสีส้มที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๑๖ ๐.๓๘ ๐.๕ ๐.๕๘ ๐.๘๒ ๐.๗๖ ๐.๗๔ และ ๐.๘๒

องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๓ (F3) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๒๘-๓๙ ปริมาณ ๓๘.๖ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีเหลืองที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๑ ๐.๗๒ และ ๐.๘๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสารสีดำ ๒ แถบ ที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) เท่ากับ ๐.๑๔ และ ๐.๘๔ เมื่อส่องภายใต้ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตรพบสารเรืองแสงสีส้มอมเหลือง ๓ แถบ ที่ระดับอาร์เอฟ($R_f$) ๐.๑ ๐.๗ และ ๐.๘

องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๔ (F4) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๔๐ – ๕๑ ปริมาณ ๑๐๑.๕ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบสารสีเหลืองที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) เท่ากับ ๐.๘๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตทความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสารสีดำที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๘๔ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นเท่ากับ ๓๖๕ นาโนเมตร พบแถบสารเรืองแสงสีฟ้า ที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๕ (F5) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๕๒-๕๕ ปริมาณ ๙.๔ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีเหลืองที่ อาร์เอฟ ๐.๘ และ ๐.๘๔ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสารสีดำที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๗ และ ๐.๙ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร พบแถบสารเรืองแสงสีน้ำเงินที่ อาร์เอฟ ๐.๙ และแถบสารเรืองแสงสีเขียวอมฟ้าที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘ และ ๐.๕

องค์ประกอบส่วนที่ ๖ (F6) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๕๖ – ๖๑ ปริมาณ ๒๑.๖ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบสารสีเหลืองที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๘๒ และ ๐.๘๘ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตรแถบสารสีดำที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๗๘ และ ๐.๙๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตรพบแถบสารเรืองแสงสีน้ำเงินที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘๘ ๐.๖๘ และ ๐.๕๒ และแถบเรืองแสงสีเขียวอมฟ้าที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘๔

องค์ประกอบส่วนที่ ๗ (F7) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๖๒-๖๙ ปริมาณ ๒๐.๖ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีเหลืองที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๘๔ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตรพบแถบสารสีดำที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘๔ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตรพบแถบสารเรืองแสงสีน้ำเงินที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๘๔

องค์ประกอบส่วนที่ ๘ (F8) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๗๐-๘๒ ปริมาณ ๒.๘ มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีเหลืองที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๘ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสีดำสองแถบที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๔ และ ๐.๘๒ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร พบแถบสารเรืองแสงสีน้ำเงินที่ระดับ อาร์เอฟ ๐.๘

องค์ประกอบส่วนที่ ๙ (F9) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ ๘๓-๑๐๗ ปริมาณ ๘.๓ มิลลิกรัมที่แสงปกติพบแถบสารสีส้มที่ระดับ อาร์เอฟ๐.๘ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร พบแถบสารสีดำ ๑ แถบที่ระดับ อาร์เอฟ๐.๘๖ และแถบสารสีส้มอมเหลืองที่ อาร์เอฟ ๐.๘ เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร แถบสารเรืองแสงสีเหลืองที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๗๒ และแถบสารเรืองแสงสีเหลืองอ่อน ๒ แถบที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๑๖ และ ๐.๖๔

หลังจากนั้นนำสารแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีเอกาดิสก์ดิฟฟิวชัน (agar disk diffusion) และไบโอออโทกราฟ (bioautographic method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ๖ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่แยกได้โดยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี**

| องค์ประกอบส่วนที่ | ลำดับส่วนที่ | น้ำหนักของสาร (มิลลิกรัม) | ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ของแถบสาร | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | แสงปกติ | แสง อัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร | แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร |
| เอฟ๑ | ๑-๑๒ | ๘.๒ | ๐.๐๔ ๐.๘ | - | ๐.๐๔ ๐.๘ |
| เอฟ๒ | ๑๓-๒๗ | ๑๕.๕ | ๐.๕ ๐.๗ ๐.๘ | ๐.๒ ๐.๓ ๐.๖ ๐.๘ | ๐.๒ ๐.๔ ๐.๕ ๐.๖ ๐.๗ ๐.๘ ๐.๘ |
| เอฟ๓ | ๒๘-๓๕ | ๓๘.๖ | ๐.๑ ๐.๗ ๐.๘ | ๐.๑ ๐.๘ | ๐.๑ ๐.๗ ๐.๘ |
| เอฟ๔ | ๔๐-๕๑ | ๑๐๑.๕ | ๐.๘ | ๐.๘ | ๐.๘ |
| เอฟ๕ | ๕๒-๕๕ | ๕.๔ | ๐.๘ ๐.๘ | ๐.๗ ๐.๕ | ๐.๕ ๐.๘ ๐.๕ |
| เอฟ๖ | ๕๖-๖๑ | ๒๑.๖ | ๐.๘ ๐.๕ | ๐.๘ ๐.๕ | ๐.๕ ๐.๗ ๐.๕ ๐.๘ |
| เอฟ๗ | ๖๒-๖๕ | ๒๐.๖ | ๐.๘ | ๐.๔ ๐.๘ | ๐.๘ |
| เอฟ๘ | ๗๐-๘๒ | ๒.๘ | ๐.๘ | ๐.๔ ๐.๘ | ๐.๘ |
| เอฟ๙ | ๘๓-๑๐๗ | ๘.๓ | ๐.๘ | ๐.๘ ๐.๕ | ๐.๒ ๐.๗ ๐.๖ |
| รวม | | ๒๓๐.๕ | | | |

## ๔.๕ ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกได้โดยเทคนิค เอกาดิสดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion) และ ไบโอออโทกราฟ (bioautographic method)

จากการแยกสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี พบรูปแบบของสารจำนวน ๙ รูปแบบ จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยเทคนิคเอกาดิสดิฟฟิวชันโดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารเท่ากับ ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าองค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๑ และ ๒ (F1, F2) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) และไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) องค์ประกอบสารสกัดส่วนที่ ๙ (F9) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๓ ๔ ๕ ๖ ๗ และ๘ (F3 F4 F5 F6 F7และ F8) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) หายไปหลังผ่านกระบวนการสกัดและแยกสาร (ตารางที่ ๗)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ๗ ผลทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของแต่ละส่วนที่แยกได้โดยวิธีเอกาดิสดิฟฟิวชัน**

| องค์ประกอบส่วนที่ | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) | ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) | บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) | สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) | เอสเชอริเชีย โคไล (*Eschericia coli*) | แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) |
| เอฟ๑ | ๘.๕ | ๑๐ | ๙ | - | - | - |
| เอฟ๒ | ๑๑.๕ | ๑๓.๕ | ๑๑.๕ | - | - | - |
| เอฟ๓ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๔ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๕ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๖ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๗ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๘ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๘ | ๘.๕ | - | - | - | - | - |

เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางโดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลอัตราส่วน ๙:๒ และทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคไบโอออโทกราฟ (bioautographic method) พบว่าองค์ประกอบส่วนที่ ๑ (F1) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ๓ ชนิดคือ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส(*Staphylococcus aureus*) ที่ระดับอาร์เอฟ เท่ากับ ๐.๗๙ และ ๐.๙๒ เชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) ที่ระดับอาร์เอฟเท่ากับ ๐.๖๒ และ ๐.๗๙ เชื้อบาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) ที่ระดับอาร์เอฟ เท่ากับ ๐.๒๙ ๐.๔๔ และ ๐.๖๖ องค์ประกอบส่วนที่ ๒ (F2) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ๓ ชนิด คือ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส ที่ระดับอาร์เอฟ เท่ากับ ๐.๓๒ ๐.๖๙ และ ๐.๙๒ เชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส ที่ระดับอาร์เอฟเท่ากับ ๐.๕ และ ๐.๗๙ เชื้อบาซิลลัส สับทิลิส ที่ระดับอาร์เอฟ เท่ากับ ๐.๓ และ ๐.๗๒ องค์ประกอบส่วนที่ ๙ (F9) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบเพียงชนิดเดียวคือ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส ที่ระดับอาร์เอฟ เท่ากับ ๐.๙๒ (ตารางที่ ๘)

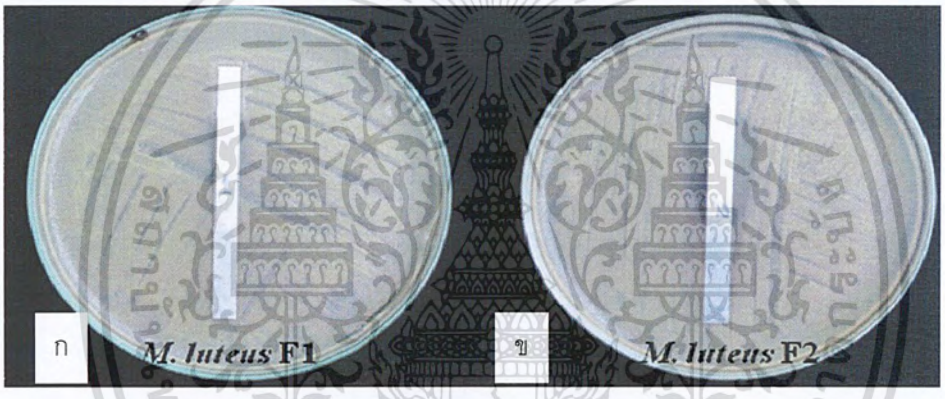
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ๘ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ขององค์ประกอบสารส่วนที่ ๑ – ๙ (F1-F9) ที่ระดับอาร์เอฟต่างๆ**

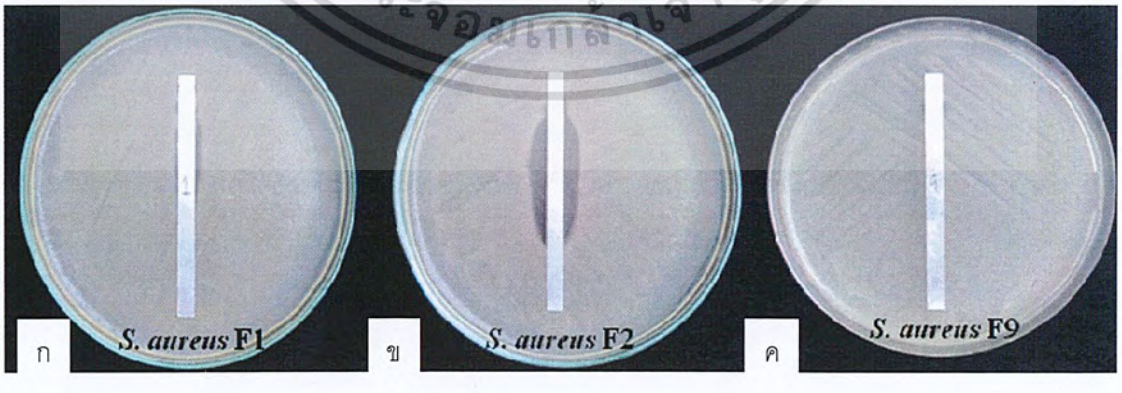
| องค์ประกอบส่วนที่ | ระดับ อาร์เอฟ($R_f$) ของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) | ไมโครคอกคัส ลูเทียส (*Micrococcus luteus*) | บาซิลลัส สับทิลิส (*Bacillus subtilis*) | สูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) | เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) | แคนดิดา แอลบิแคนส์ (*Candida albicans*) |
| เอฟ๑ | ๐.๘ ๐.๘ | ๐.๖ ๐.๘ | ๐.๓ ๐.๔ ๐.๗ | - | - | - |
| เอฟ๒ | ๐.๓ ๐.๗ ๐.๙ | ๐.๕ ๐.๘ | ๐.๓ ๐.๗ | - | - | - |
| เอฟ๓ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๔ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๕ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๖ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๗ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๘ | - | - | - | - | - | - |
| เอฟ๙ | ๐.๙ | - | - | - | - | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ ๒๙** ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารองค์ประกอบส่วนที่ 1 (ก) และส่วนที่ 2 (ข) ต่อเชื้อบาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)




**รูปที่ ๓๐** ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารองค์ประกอบส่วนที่ ๑ (ก) และส่วนที่ ๒ (ข) ต่อเชื้อไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341)




**รูปที่ ๓๑** ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารองค์ประกอบส่วนที่ ๑ (ก) ส่วนที่ ๒ (ข) และส่วนที่ ๙ (ค) ต่อเชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ ๕
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน ๑๔ ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแอคติโนมัยสีททางทะเล จำนวน ๙ ไอโซเลต และ แอคติโนมัยสีทจากดินจำนวน ๕ ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง ๑๔ ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในอาหาร ยีสต์สกัด-มอลต์สกัด จากการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้นสามารถแบ่งกลุ่มแอคติโนมัยสีทออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ ๑ มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุลสเตรปโตมัยเซส *(Streptomyces)* จำนวน ๑๑ ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตเอ็นอาร์๑-๑๓ เอสเอ็ม๙-๓ อาร์บี ๓-๑ เอสเอ็ม๗-๖ เอสเอ็ม๕-๑ เอส๗เอฟ-๐๔ เอส๗เอฟ-๐๖ พีเอ็น๑-๑ เอส๗เอฟ-๒๕ เอสเอ็ม๗-๓ และ เอสที๐๑-๐๔ กลุ่มที่๒ มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุลไมโครโมโนสปอรา *(Micromonospora)* จำนวน ๓ ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตเอสพี๒๐๖-๐๘ เอสพี๒๐๘-๐๑ และเอสที๐๔-๐๕

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทด้วยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชันพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีท ๗ ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลต เอสที๐๔-๐๕ อาร์บี๓-๑ และ เอส๗เอฟ-๐๖ สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างละ ๑ ชนิดคือ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) เชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) ตามลำดับ ไอโซเลต เอสเอ็ม๙-๓ เอสเอ็ม๗-๖ และ เอส๗เอฟ-๒๕ สามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๓ ชนิด คือ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และ ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) ไอโซเลตพีเอ็น๑-๑ สามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๔ ชนิดคือ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) เชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) และแคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) ในขณะที่ไอโซเลต เอส๗เอฟ-๐๔ เอสเอ็ม๗-๓ เอ็นอาร์๑-๑๓ เอสที๐๑-๐๔ เอสเอ็ม๕-๑ เอสพี ๒๐๘-๐๑ และ เอสพี๒๐๖-๐๘ ไม่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต พีเอ็น๑-๑ มาเลี้ยงเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณมาก จำนวน ๘ ลิตร ได้สารสกัดหยาบปริมาณ ๒๗๐ มิลลิกรัม คิดเป็น ร้อยละ ๓.๓๗ เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟีและตรวจสอบรูปแบบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง สามารถแยกสารออกเป็น ๙ รูปแบบ จากนั้นนำแต่ละส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีเอกาดิสดิฟฟิวชัน พบว่าองค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ ๑ (F1) และส่วนที่ ๒ (F2) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ๓ ชนิดคือ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) เชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) และไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑(*Micrococcus luteus* ATCC 9341) โดยองค์ประกอบของสารส่วนที่ ๑ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อสแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) เท่ากับ ๐.๗๘ และ ๐.๘๒ ยับยั้งเชื้อ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) ที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๒๘ ๐.๔๔ และ ๐.๖๖ ยับยั้งเชื้อ ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) ที่ระดับอาร์เอฟ ($R_f$) ๐.๖๒ และ ๐.๗๘ สำหรับองค์ประกอบส่วนที่ ๒ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) เท่ากับ ๐.๓๒ ๐.๖๘ และ ๐.๙๒ เชื้อ ไมโครคอกคัส ลูเทียส เอทีซีซี ๙๓๔๑ (*Micrococcus luteus* ATCC 9341) ที่ระดับ อาร์เอฟ ($R_f$) เท่ากับ ๐.๕ และ ๐.๗๘ เชื้อ บาซิลลัส สับทิลิส เอทีซีซี ๖๖๓๓ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) ที่ระดับ อาร์เอฟเท่ากับ ๐.๓ และ ๐.๗๒ องค์ประกอบส่วนที่ ๙ (F9) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อสเตรปฟิโลคอกคัส ออเรียส เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) เพียงชนิดเดียวที่ระดับ อาร์เอฟ๐.๙๒ ในขณะที่องค์ประกอบส่วนที่ ๓ ๔ ๕ ๖ ๗ และ ๘ ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใดๆ สำหรับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) ที่พบในขั้นตอนคัดเลือกเชื้อโดยวิธีเอกาเวลดิฟฟิวชัน (agar well diffusion) ได้หายไป ซึ่งสันนิษฐานเบื้องต้นได้ว่าเกิดจากสาเหตุ คือ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่เชื้อ แคนดิดา แอลบิแคนส์ เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ (*Candida albicans* ATCC 10231) อาจมีความเป็นขั้วสูงจึงไม่ถูกสกัดออกมาเมื่อใช้เอทิลอะซีเตต ดังนั้นจึงอาจต้องมีการศึกษาวิธีการสกัดสารชนิดนี้เพิ่มเติม

จากงานวิจัยนี้สามารถอนุมานได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษาพัฒนาองค์ความรู้เพื่อความเข้าใจในเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้และสามารถค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. บรรณาธิการ. ๒๕๔๑. โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ ๒. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล

กำพล ศรีวัฒนกุล. ๒๕๓๘. ยาต้านจุลชีพ. คู่มือการใช้ยาฉบับสมบูรณ์. พิมพ์ครั้งที่ ๓. กรุงเทพฯ : สยาม สปอร์ต ซินดิเคต

จิราพร วรเสน. ๒๕๔๕. ไวรัส แบคทีเรีย และพาราสิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. ๒๕๕๒. แบคทีเรียแอคติโนมัยสีท. *Science in action*. ปีที่ ๕ ฉบับที่ ๔. ๒๓

ปรีชาและนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. ๒๕๔๘. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ ๕. ก รุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ .๒๕๔๘. แอคติโนมัยซีท. พิมพ์ครั้งที่ ๑. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูล. ๒๕๕๑. แอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนที่สร้างสารแอนติไบโอแอคทีฟยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. แผนการวิจัย พื่ชสมุนไพรและภูมิปัญญาแพทย์แผนไทย : หน้า ๑๐.

วาสินี ธรรมสถิต, ศุจินันท์ ยาประเสริฐ และ เมธี เอกเศวตอนันต์. ๒๕๕๒. การแยกและการตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดกระบี่. ปริญญานิพนธ์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนลีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สินีนาถ กันธิพรรณ์, อากรณัท รัตนวงษ์ และ อุมาพร ลิขิตวิเศษกุล. ๒๕๕๒. ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีททางทะเล. ปริญญานิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สุพจน์ ไช้เทียมวงศ์. ๒๕๔๕. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ ๙. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ภัทรชัย กีรติสิน.๒๕๕๑. ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ ๒. กรุงเทพฯ : วีเจ พริ้นติ้ง

Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics.* 58: 1-26

Kawamoto, L 1989. Genus *Micromonospora* ørskov 1923, 147$^{AL}$. In Williams, Sharpe, and Holt (eds). Berges's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore. pp.2442-2450

Lorian, V. 1980. Antibiotic in laboratory medicine. Williams and Walkins company. Baltimore

Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.

Shinji, M.Editor. 1997. Atlas of actinomycetes.Japan:Society for actinomycetes Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

William, S, T., Goodfellow, M. and Anderson, G., 1989. Genus *Streptomyces* Wakman and Henrici 1943,339$^{AL}$ In Williams,Sharpe, and Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore. pp.2452-2492

[Online].Available : colors.bravo9.com/nbs-iscc-rc-rock-color-chart/

[Online].Available : en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

**Yeast extract – malt extract agar (YMA), ISP2**

| | | |
|---|---|---|
| Yeast extract | ๐.๔ | กรัม |
| Malt extract | ๑ | กรัม |
| Glucose | ๐.๔ | กรัม |
| Agar | ๑.๕-๑.๘ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.3

**Oatmeal agar (OM), ISP3**

| | | |
|---|---|---|
| Oatmeal | ๒.๐ | กรัม |
| Agar | ๑.๘ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

**Inorganic salt – starch agar, (ISP4)**

| | | |
|---|---|---|
| Soluble starch | ๑.๐ | กรัม |
| $K_2HPO_4.7H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| NaCl | ๐.๑ | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | ๐.๒ | กรัม |
| $CaCO_3$ | ๐.๒ | กรัม |
| Trace salt solution (A) | ๐.๑ | มิลลิลิตร |
| Agar | ๒.๐ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.0-7.4

**Glycerol – asparagines agar (GlyA), ISP5**

| | | |
|---|---|---|
| Glycerol | ๑.๐ | กรัม |
| L – asparagines | ๐.๑ | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | ๐.๑ | กรัม |
| Trace salt solution (A) | ๐.๑ | มิลลิลิตร |
| Agar | ๒.๐ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

**Tyrosine agar (TA), ISP7**

| | | |
|---|---|---|
| Glycerol | ๑.๕ | กรัม |
| L – Tyrosine | ๐.๐๕ | กรัม |
| L – Asparagine | ๐.๑ | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | ๐.๐๕ | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ๐.๐๕ | กรัม |
| NaCl | ๐.๐๕ | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | ๐.๐๑ | กรัม |
| Trace salt solution (A) | ๐.๑ | มิลลิลิตร |
| Agar | ๒.๐ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |
| pH 7.2-7.4 | | |

**Carbon utilization medium, ISP9**

| | | |
|---|---|---|
| Carbohydrate | ๑.๐ | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | ๐.๒๖๔ | กรัม |
| $K_2HPO_4.3H_2O$ | ๐.๕๖๕ | กรัม |
| $KH_2PO_4$. anhydrous | ๐.๒๓๘ | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| Pridham and Gottlieb trace salt (B) | ๐.๑ | มิลลิลิตร |
| Agar | ๑.๕ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |
| pH 6.8 – 7.0 | | |
| Casamino acid 0.05% | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Nutrient agar, NA**

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | ๑.๐ | กรัม |
| Peptone | ๑.๐ | กรัม |
| NaCl | ๐.๑๕ | กรัม |
| Agar | ๑.๕ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

**Glucose asparagine agar**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | ๑.๐ | กรัม |
| Asparagine | ๐.๐๕ | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | ๐.๐๕ | กรัม |
| Agar | ๑.๕ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 6.8-7.0

**Czapek's sucrose agar**

| | | |
|---|---|---|
| Sucrose | ๓.๐ | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | ๐.๑ | กรัม |
| $MgSO_4$ | ๐.๐๕ | กรัม |
| KCl | ๐.๐๕ | กรัม |
| $FeSO_4$ | ๐.๐๐๑ | กรัม |
| Agar | ๑.๗ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.0 -7.2

**Peptone $KNO_3$ broth**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | ๑.๐ | กรัม |
| $KNO_3$ | ๐.๑ | กรัม |
| NaCl | ๐.๕ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Boullion gelatin broth**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | ๑.๐ | กรัม |
| Meat extract | ๐.๕ | กรัม |
| NaCl | ๐.๕ | กรัม |
| Gelatin | ๑๕.๐ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.0 -7.2

**Peptenization and Coagulation test medium**

| | | |
|---|---|---|
| Skim milk | ๑๐.๐ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

**Basal inorganic nitrogen medium**

| | | |
|---|---|---|
| Carbohydrate | ๑๐.๐ | กรัม |
| $(NH)_4HPO_4$ | ๐.๑ | กรัม |
| KCl | ๐.๐๒ | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ๐.๐๒ | กรัม |
| 0.04% Bromocresol purple | ๑.๕ | มิลลิลิตร |
| Agar | ๑.๕ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

pH 7.0

**Trace salt solution (A)**

| | | |
|---|---|---|
| $FeSO_4.7H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| $MnCl_2.4H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | ๐.๑ | กรัม |
| Water | ๑๐๐ | มิลลิลิตร |

**Pridham and Gottlieb trace salt (B)**

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4.5H_2O$ | ๐.๖๔ | กรัม |
| $FeSO_4.7H_2O$ | ๐.๑๑ | กรัม |
| $MnCl_2.4H_2O$ | ๐.๗๘ | กรัม |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | ๐.๑๕ | กรัม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**น้ำทะเลเทียม (Synthetic sea salt, Marinium)**

| | |
|---|---|
| Chlorine | ๑.๙๐ x ๑๐$^{๔}$ |
| Sodium | ๑.๐๕ x ๑๐$^{๔}$ |
| Magnesium | ๑.๔๑ x ๑๐$^{๓}$ |
| Sulfur | ๘.๘๕ x ๑๐$^{๓}$ |
| Calcium | ๔.๒๐ x ๑๐$^{๒}$ |
| Potassium | ๓.๘๐ x ๑๐$^{๒}$ |
| Bromine | ๖.๕ x ๑๐$^{๑}$ |
| Boron | ๘.๑๐ x ๑๐$^{๐}$ |
| Strontium | ๔.๖ x ๑๐$^{๐}$ |
| Fluorine | ๑.๓๐ x ๑๐$^{๐}$ |
| Lithium | ๑.๘๐ x ๑๐$^{-๑}$ |
| Rubidium | ๑.๓๐ x ๑๐$^{-๑}$ |
| Iodine | ๖.๐๒ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Barium | ๓.๓๐ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Aluminium | ๑.๐๓ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Iron | ๑.๑๐ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Molybdenum | ๑.๐๕ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Zinc | ๑.๐๐ x ๑๐$^{-๒}$ |
| Manganese | ๒.๑๐ x ๑๐$^{-๓}$ |
| Vanadium | ๒.๓๕ x ๑๐$^{-๓}$ |
| Cobalt | ๔.๖๕ x ๑๐$^{-๔}$ |

Value in ppm (part per million)

เสริมวิตามิน Ascorbic acid, Thiamine hydrochloride, Riboflavine, Nicotinamide, Calcium Pantothenate, Pyridoxine hydrochlorid, Cyanocobalamin, Choline bitartate, Inositol, Biotin, Folic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

## ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่างๆ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (NBS-ISCC color system)

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะสีของเส้นใยอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสเอ็ม ๙-๓ (SM9-3) | ISP2 | ดีมาก | เทาอมน้ำตาลสว่าง | เทาอมชมพู | - |
| | ISP3 | ดีมาก | ขาว | น้ำตาลอมเหลืองเข้ม | - |
| | ISP7 | ดีมาก | ขาว | ชมพูอมเหลือง | - |
| | ISP4 | ดีมาก | เทาอมฟ้า | เขียวมะกอกสว่าง | - |
| | ISP5 | ดีมาก | เทาอมเหลือง | เหลืองอมเทา | - |
| | Cz.Sucrose | น้อย | ขาว | ขาว | - |
| | Glu.A | ดีมาก | เทาอมเขียวสว่าง | เทาอมเขียวสว่าง | - |
| | N.A | ปานกลาง | ขาวอมเหลือง | เหลืองอมเทา | - |
| | P.I.A | ดีมาก | ขาวอมชมพู | เหลืองอมส้มกลาง | - |
| อาร์บี ๓-๑ (RB3-1) | ISP2 | ดีมาก | ขาว | ส้มเรืองแสง | ส้มเข้ม |
| | ISP3 | ดีมาก | ขาว | เหลืองซีด | - |
| | ISP7 | ดีมาก | ฟ้าซีด | เขียวมะกองกลาง | - |
| | ISP4 | ดีมาก | น้ำตาลสว่าง | ชมพูอมเหลืองซีด | ส้มสว่าง |
| | ISP5 | ดีมาก | ชมพูสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง |
| | Cz.Sucrose | ดี | ชมพูสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง |
| | Glu.A | ดี | เหลืองสว่าง | ขาวอมชมพู | - |
| | N.A | ดีมาก | ชมพูอมเหลือง | ชมพูอมเหลืองซีด | - |
| | P.I.A | ดี | เหลืองอมเทา | เหลืองอมเทา | เขียวอมเหลืองเข้ม |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นใยอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสอ็ม ๙-๖ (SM9-6) | ISP2 | ดีมาก | ชมพูอมฟ้า | ส้มอมแดงเข้ม | ชมพูคล้ำ |
| | ISP3 | ดี | ขาว | เหลืองเข้ม | - |
| | ISP7 | ปานกลาง | ชมพูอมเหลืองสด | ชมพูอมเหลืองสด | - |
| | ISP4 | ดีมาก | เทา | แดงเข้ม | น้ำตาลอมส้มเหลืองสว่าง |
| | ISP5 | ดีมาก | ชมพูสว่าง | ชมพูสด | ชมพูมืด |
| | Cz.Sucrose | ดี | ชมพูสว่าง | ชมพูสว่าง | ม่วงสว่าง |
| | Glu.A | ดีมาก | ขาวอมชมพู | เหลืองอมส้มซีด | - |
| | N.A | ดี | ชมพูอมเหลืองสว่าง | ชมพูอมเหลืองเข้ม | - |
| | P.I.A | ดี | ขาว | ดำอมน้ำตาล | เขียวอมเทาเหลืองมืด |
| เอส๗ เอฟ-๐๖ (S7F-06) | ISP2 | ดีมาก | เทาอมชมพู | ส้มสว่าง | - |
| | ISP3 | ดีมาก | ขาว | เหลืองกลาง | - |
| | ISP7 | ดี | เทาอมเหลือง | เหลืองซีด | - |
| | ISP4 | ดีมาก | เทาปานกลาง | เหลืองอมส้มซีด | - |
| | ISP5 | ดี | เหลืองอมเขียวปนเทา | เหลืองอมเขียวกลาง | - |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | ขาวอมชมพู | ขาวอมชมพู | - |
| | Glu.A | ดีมาก | ขาวอมเหลือง | เหลืองซีด | - |
| | N.A | ดีมาก | เทาปานกลาง | เหลืองอมเขียวเข้ม | - |
| | P.I.A | ดีมาก | ขาวอมชมพู | เหลืองอมส้มสว่าง | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นใยอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสเอ็ม ๗-๓ (SM7-3) | ISP2 | ดีมาก | เทาอมฟ้า | น้ำตาลอมเหลืองเข้ม | - |
| | ISP3 | ดีมาก | เทากลาง | น้ำตาลอมเขียวมะกอกมืด | - |
| | ISP7 | ดีมาก | เทาสว่าง | ส้มสด | เทาสว่าง |
| | ISP4 | ดีมาก | เทาสว่าง | เหลืองอมส้มซีด | - |
| | ISP5 | ดีมาก | เทากลาง | เหลืองกลาง | - |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | เหลืองอมส้มซีด | เหลืองอมส้มซีด | - |
| | Glu.A | ดี | เหลืองมืด | เหลืองกลาง | - |
| | N.A | ดีมาก | เทากลาง | เหลืองอมเทาเขียว | - |
| | P.I.A | ดีมาก | ขาวอมชมพู | เหลืองอมส้มเฉียบ | - |
| เอสที ๐๑-๐๔ (ST01-04) | ISP2 | ดีมาก | ขาว | เขียวอมเทาเหลือง | - |
| | ISP3 | ดี | เหลืองอมเขียวซีด | เหลืองอมเขียวซีด | - |
| | ISP7 | ดีมาก | เขียวอมเหลืองมืด | ขาวอมเขียว | - |
| | ISP4 | ดี | เขียวอมเหลืองสว่าง | เขียวอมเหลืองเฉียบ | - |
| | ISP5 | ดีมาก | ขาวอมเหลือง | น้ำตาลอมมะกอกคล้ำ | ส้มอมแดงเข้ม |
| | Cz.sucrose | น้อยมาก | ไม่มีสี | ไม่มีสี | - |
| | Glu.A | ดี | ขาวอมเหลือง | น้ำตาลอมมะกอกสว่าง | น้ำตาลอมเขียวมะกอกกลาง |
| | N.A | ดีมาก | ขาว | เหลืองอมเขียวสด | - |
| | P.I.A | ดี | เหลืองเฉียบ | ส้มเข้ม | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นใยอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอส๗เอฟ-๒๕ (S7F-25) | ISP2 | ดี | ขาว | น้ำตาลคล้ำ | น้ำตาลมะกอกกลาง |
| | ISP3 | ดีมาก | ขาว | เหลืองอมเขียวเข้ม | - |
| | ISP7 | ปานกลาง | ขาวอมเหลือง | เหลืองคล้ำ | เทามะกอก |
| | ISP4 | ดีมาก | เทามืด | น้ำตาลกลาง | เหลืองอมน้ำตาลสว่าง |
| | ISP5 | ดีมาก | เทาอมเหลือง | น้ำตาลมะกอกสว่าง | เหลืองอมเขียวเข้ม |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | เหลืองซีด | เหลืองซีด | - |
| | Glu.A | ดี | ขาวอมเหลือง | เหลืองมืด | เหลืองเข้ม |
| | N.A | ดี | เทาอมส้มสว่าง | น้ำตาลมะกอกกลาง | เหลืองอมเทาเขียว |
| | P.I.A | ปานกลาง | ขาว | น้ำตาลมะกอกสว่าง | น้ำตาลอมแดงเข้ม |
| เอส๗เอฟ-๐๔ (S7F-04) | ISP2 | ดีมาก | ขาว | เหลืองอมเขียวมืด | - |
| | ISP3 | ดีมาก | เทาอมเขียวสว่าง | เหลืองอมเขียวเข้ม | - |
| | ISP7 | ดีมาก | ขาวอมเหลือง | ดำ | ดำมะกอก |
| | ISP4 | ดีมาก | เทาสว่าง | เหลืองอมส้มเฉียด | - |
| | ISP5 | ดี | เทาสว่าง | เหลืองเข้ม | - |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | เหลืองอมส้มสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง | - |
| | Glu.A | ดี | เหลืองสด | เหลืองอมส้มเฉียบ | - |
| | N.A | ดี | เทาสว่าง | เหลืองมืด | - |
| | P.I.A | ดีมาก | เทามะกอกสว่าง | เหลืองอมส้มมืด | น้ำตาลอมเหลืองคล้ำ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสพี ๒๐๘-๐๑ (SP208-01) | ISP2 | ดีมาก | ส้มคล้ำ | ส้มคล้ำ | - |
| | ISP3 | ดีมาก | ส้มคล้ำ | ส้มสด | - |
| | ISP7 | น้อย | ขาวอมชมพู | ขาวอมชมพู | - |
| | ISP4 | ดี | ส้มอมน้ำตาล | น้ำตาลสว่าง | - |
| | ISP5 | ดีมาก | ส้มเข้ม | ส้มเข้ม | - |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | น้ำตาลอมเหลืองคล้ำ | ส้มคล้ำ | - |
| | Gku.A | ดี | ส้มคล้ำ | น้ำตาลอมเหลืองคล้ำ | - |
| | N.A | ดีมาก | ส้มคล้ำ | ส้มคล้ำ | - |
| | P.I.A | ปานกลาง | ส้มสด | ส้มสด | - |
| เอสพี ๒๐๖-๐๘ (SP206-08) | ISP2 | ดี | ส้มสด | ส้มสด | - |
| | ISP3 | ดีมาก | เหลืองอมส้มกลาง | เหลืองอมส้มกลาง | - |
| | ISP7 | น้อยมาก | ส้มเข้ม | ส้มเข้ม | - |
| | ISP4 | น้อยมาก | เหลืองอมส้มสว่าง | เหลืองอมส้มสว่าง | - |
| | ISP5 | ปานกลาง | ชมพูอมเหลืองเข้ม | ชมพูอมเหลืองเข้ม | - |
| | Cz.Sucrose | น้อย | เหลืองอมส้มเข้ม | เหลืองอมส้มเข้ม | - |
| | Glu.A | น้อย | เหลืองอมส้มกลาง | เหลืองอมส้มกลาง | - |
| | N.A | ดีมาก | ส้มคล้ำ | ส้มคล้ำ | - |
| | P.I.A | ปานกลาง | เหลืองอมส้มเข้ม | เหลืองอมส้มเข้ม | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นใยอาหาร | สีรงควัฤที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสเอ็ม ๕-๑ (SM5-1) | ISP2 | ดี | ขาว | เหลืองอมส้มมืด | ชมพูอมน้ำตาล |
| | ISP3 | ดีมาก | ขาว | น้ำตาลสว่าง | - |
| | ISP7 | ดีมาก | ขาว | น้ำตาลปนเทาเหลืองสว่าง | - |
| | ISP4 | ดีมาก | ขาวอมเขียว | เทาเข้มสว่าง | - |
| | ISP5 | ดีมาก | ขาวอมชมพู | เหลืองปานกลาง | - |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | น้ำตาลอมเขียวสว่าง | น้ำตาลอมเขียวสว่าง | - |
| | Glu.A | ดีมาก | ขาว | ชมพูอมเหลืองคล้ำ | - |
| | N.A | ดีมาก | ขาวอมเหลือง | เหลืองซีด | - |
| | P.I.A | น้อย | ขาว | เหลืองมืด | เขียวอมฟ้าคล้ำ |
| เอ็นอาร์ ๑-๑๓ (NR1-13) | ISP2 | ดีมาก | เหลืองอมเขียวมืด | เหลืองอมเขียวมืด | เขียวอมเหลืองคล้ำ |
| | ISP3 | ดีมาก | เขียวมะกอก | มะกอกมืด | มะกอกกลาง |
| | ISP7 | ดีมาก | น้ำตาลอมเทาเหลือง | น้ำตาลอมเทาเหลือง | - |
| | ISP4 | ดีมาก | น้ำตาลอมเขียวปนเทาเหลือง | มะกอกอมเทาสว่าง | - |
| | ISP5 | ดีมาก | เหลืองอมเขียวมืด | มะกอกสว่าง | มะกอกอมเทา |
| | Cz.Sucrose | ดี | น้ำตาลอมเทาเหลืองสว่าง | น้ำตาลอมเทาเหลืองสว่าง | - |
| | Glu.A | ดี | เหลืองอมเทาเขียว | เหลืองอมเทาเขียว | - |
| | N.A | ปานกลาง | มะกอกกลาง | เหลืองอมเทาเขียว | - |
| | P.I.A | ดี | เหลืองกลาง | เหลืองมืด | - |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| รหัสเชื้อ | อาหาร | การเจริญ | ลักษณะสีของเส้นใยอากาศ | ลักษณะของเส้นใยอาหาร | สีรงควัตถุที่สร้าง |
|---|---|---|---|---|---|
| เอสที๐๔-๐๕ (ST04-05) | ISP2 | ดีมาก | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | - |
| | ISP3 | ดีมาก | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | - |
| | ISP7 | น้อยมาก | ส้มสว่าง | ส้มสว่าง | - |
| | ISP4 | ดี | น้ำตาลสว่าง | น้ำตาลสว่าง | - |
| | ISP5 | ดีมาก | น้ำตาลมะกอกกลาง | น้ำตาลมะกอกกลาง | - |
| | Cz.Sucrose | น้อย | น้ำตาลสว่าง | น้ำตาลสว่าง | - |
| | Glu.A | ดีมาก | เหลืองอมส้มมืด | เหลืองอมส้มมืด | - |
| | N.A | ดีมาก | ส้มคล้ำ | ส้มคล้ำ | - |
| | P.I.A | ดีมาก | เหลืองอมส้มมืด | เหลืองอมส้มมืด | - |
| พีเอ็น๑-๑ (PN1-1) | ISP2 | ดีมาก | เขียวอมเทามะกอก | ส้มอมแดงคล้ำ | น้ำตาลอมเทาแดง |
| | ISP3 | ดีมาก | เขียวอมเทาเหลือง | เหลืองอมส้มคล้ำ | น้ำตาลอมเหลืองคล้ำ |
| | ISP7 | ดีมาก | ขาวอมเขียว | เขียวอมดำ | เขียวอมดำ |
| | ISP4 | ดีมาก | เทาปานกลาง | น้ำตาลอมเหลืองกลาง | ฟ้าอมม่วงสว่าง |
| | ISP5 | ดีมาก | เทาปานกลาง | ชมพูกลาง | ชมพูอมเทา |
| | Cz.Sucrose | ปานกลาง | เหลืองซีด | เหลืองซีด | - |
| | Glu.A | ดีมาก | ขาวอมเหลือง | ชมพูกลาง | ชมพูอมเทา |
| | N.A | ดีมาก | เทามะกอกสว่าง | ส้มอมแดงคล้ำ | มะกอกเทาคล้ำ |
| | P.I.A | ดีมาก | เทาอมน้ำตาลสว่าง | น้ำตาลมืด | น้ำตาลเข้ม |

**หมายเหตุ** ISP2 = yeast extract malt extract agar

ISP 3 = oatmeal agar

ISP4 = inorganic salt - starch agar

ISP5 = glycerol – asparagines agar

ISP7 = Tyrosine agar

NA = nutrient agar

Glu. A = Glucose asparagine agar

Cz Sucrose = Czapek's sucrose agar

P.I.A. = peptone iron agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## The NBS/IBCC Color System

## The 267 Color Centroids

| Centroid | Munsell | RGB | Swatch |
|---|---|---|---|
| **Red, Pink** | | | |
| **1 Vivid Pink** | 1r 8.0 13.0 | #FF7E93 | |
| **2 Strong Pink** | 1.2r 6.9 8.2 | #FD7B7C | |
| **3 Deep Pink** | 2.1r 6.0 11.1 | #F3545E | |
| **4 Light Pink** | 2.6r 8.5 4.0 | #FFBCAD | |
| **5 Moderate Pink** | 2.8r 7.2 5.3 | #EE9086 | |
| **6 Dark Pink** | 2.7r 5.9 6.1 | #C76864 | |
| **7 Pale Pink** | 2.0r 8.7 2.1 | #FFCBBB | |
| **8 Grayish Pink** | 2.6r 7.2 2.3 | #CF9B8F | |
| **9 Pinkish White** | 5.8r 9.0 0.8 | #F9DBC8 | |
| **10 Pinkish Gray** | 9.8r 7.4 1.0 | #C8A696 | |
| **11 Vivid Red** | 5.0r 3.9 15.4 | #C10020 | |
| **12 Strong Red** | 4.0r 4.4 12.1 | #BF2233 | |
| **13 Deep Red** | 5.1r 2.8 10.1 | #7B001C | |
| **14 Very Deep Red** | 6.5r 1.7 8.4 | #4F0014 | |
| **15 Moderate Red** | 3.8r 4.4 9.1 | #AB343A | |
| **16 Dark Red** | 4.0r 2.8 6.8 | #681C23 | |
| **17 Very Dark Red** | 2.0r 1.2 4.8 | #320A18 | |
| **18 Light Grayish Red** | 5.3r 5.9 3.5 | #B17267 | |
| **19 Grayish Red** | 4.0r 4.4 4.8 | #8C4743 | |
| **20 Dark Grayish Red** | 2.9r 2.7 2.1 | #482A2A | |
| **21 Blackish Red** | 3.9r 0.8 1.7 | #1F0E11 | |
| **22 Reddish Gray** | 7.0r 5.4 1.3 | #8B6C62 | |
| **23 Dark Reddish Gray** | 6.0r 3.4 1.0 | #523C36 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **24 Reddish Black** | 2.0r 0.9 0.9 | #1E1112 |
| **Yellowish Pink** | | |
| **25 Vivid Yellowish Pink** | 8.0r 8.0 13.0 | #FF845C |
| **26 Strong Yellowish Pink** | 8.4r 7.0 9.5 | #FF7A5C |
| **27 Deep Yellowish Pink** | 5.5r 5.8 12.1 | #F64A46 |
| **28 Light Yellowish Pink** | 1.9yr 8.2 4.6 | #FFB28B |
| **29 Moderate Yellowish Pink** | 0.7yr 7.2 4.9 | #EE9374 |
| **30 Dark Yellowish Pink** | 7.0r 6.0 6.1 | #CC6C5C |
| **31 Pale Yellowish Pink** | 4.2yr 8.6 2.2 | #FFC8A8 |
| **32 Grayish Yellowish Pink** | 1.3yr 7.2 2.4 | #D39B85 |
| **Reddish Orange, Reddish Brown** | | |
| **33 Brownish Pink** | 7.0yr 7.1 2.3 | #CD9A7B |
| **34 Vivid Reddish Orange** | 9.8r 5.4 14.5 | #F13A13 |
| **35 Strong Reddish Orange** | 9.3r 5.4 12.2 | #FFB961 |
| **36 Deep Reddish Orange** | 9.2r 3.9 12.1 | #A91D11 |
| **37 Moderate Reddish Orange** | 9.3r 5.5 9.2 | #D35339 |
| **38 Dark Reddish Orange** | 9.3r 4.0 9.1 | #9B2F1F |
| **39 Grayish Reddish Orange** | 0.4yr 5.4 6.2 | #B85D43 |
| **40 Strong Reddish Brown** | 0.3yr 3.1 9.9 | #7F180D |
| **41 Deep Reddish Brown** | 1.6yr 1.5 8.3 | #490005 |
| **42 Light Reddish Brown** | 0.5yr 5.5 4.1 | #AA6651 |
| **43 Moderate Reddish Brown** | 9.0r 3.4 5.2 | #712F26 |
| **44 Dark Reddish Brown** | 9.6r 1.3 3.6 | #321011 |
| **45 Light Grayish Reddish Brown** | 2.9yr 5.4 2.3 | #966A57 |
| **46 Grayish Reddish Brown** | 9.0r 3.4 2.4 | #5E3830 |
| **47 Dark Grayish Reddish Brown** | 9.0r 2.0 2.0 | #371F1C |
| **Orange Brown** | | |
| **48 Vivid Orange** | 4.1yr 6.5 15.0 | #FF6800 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **49 Brilliant Orange** | 4.0yr 9.0 12.0 | #FFB841 | |
| **50 Strong Orange** | 4.3yr 6.5 12.2 | #FF6F1A | |
| **51 Deep Orange** | 4.1yr 5.1 11.3 | #C34D0A | |
| **52 Light Orange** | 4.8yr 7.8 7.2 | #FFA161 | |
| **53 Moderate Orange** | 4.6yr 6.5 8.2 | #E8793E | |
| **54 Brownish Orange** | 4.1yr 5.0 8.0 | #B15124 | |
| **55 Strong Brown** | 4.6yr 3.5 7.6 | #753313 | |
| **56 Deep Brown** | 5.6yr 2.4 5.2 | #4D220E | |
| **57 Light Brown** | 5.4yr 5.4 4.8 | #A86540 | |
| **58 Moderate Brown** | 5.6yr 3.5 3.9 | #673923 | |
| **59 Dark Brown** | 5.3yr 1.6 3.4 | #35170C | |
| **60 Light Grayish Brown** | 6.4yr 5.4 2.2 | #946B54 | |
| **61 Grayish Brown** | 5.5yr 3.5 1.8 | #5A3D30 | |
| **62 Dark Grayish Brown** | 5.5yr 2.0 1.5 | #32221A | |
| **63 Light Brownish Gray** | 7.0yr 5.4 1.2 | #8B6D5C | |
| **64 Brownish Gray** | 5.65r 3.4 0.9 | #503D33 | |
| **65 Brownish Black** | 7.8yr 0.6 0.9 | #140F0B | |
| **Orange Yellow, Yellowish Brown** | | | |
| **66 Vivid Orange Yellow** | 8.6yr 7.3 15.2 | #FF8E00 | |
| **67 Brilliant Orange Yellow** | 0.1y 8.1 10.5 | #FFB02E | |
| **68 Strong Orange Yellow** | 9.1yr 7.1 11.6 | #FF8E0D | |
| **69 Deep Orange Yellow** | 8.6yr 6.0 12.1 | #D76E00 | |
| **70 Light Orange Yellow** | 9.4yr 8.3 6.8 | #FFB961 | |
| **71 Moderate Orange Yellow** | 8.7yr 7.2 8.3 | #F7943C | |
| **72 Dark Orange Yellow** | 9.3yr 6.0 7.9 | #C37629 | |
| **73 Pale Orange Yellow** | 9.2yr 8.7 4.4 | #FFCA86 | |
| **74 Strong Yellowish Brown** | 8.8yr 4.6 8.5 | #95500C | |
| **75 Deep Yellowish Brown** | 8.8yr 3.1 5.0 | #593315 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **76 Light Yellowish Brown** | 8.7yr 6.5 5.0 | #BB8B54 | |
| **77 Moderate Yellowish Brown** | 9.5yr 4.4 3.9 | #7D512D | |
| **78 Dark Yellowish Brown** | 9.4yr 2.3 3.3 | #3F2512 | |
| **79 Light Grayish Yellowish Brown** | 9.7yr 6.4 2.5 | #B48764 | |
| **80 Grayish Yellowish Brown** | 9.5yr 4.6 2.1 | #785840 | |
| **81 Dark Grayish Yellowish Brown** | 8.8yr 2.5 1.6 | #3D2B1F | |
| **Yellow, Olive Brown** | | | |
| **82 Vivid Yellow** | 3.3y 8.0 14.3 | #FFB300 | |
| **83 Brilliant Yellow** | 4.4y 8.7 8.9 | #FFCF40 | |
| **84 Strong Yellow** | 3.7y 7.2 9.3 | #E59E1F | |
| **85 Deep Yellow** | 3.7y 5.9 9.1 | #B57900 | |
| **86 Light Yellow** | 4.3y 8.8 6.8 | #FFD35F | |
| **87 Moderate Yellow** | 3.8y 7.1 6.5 | #D79D41 | |
| **88 Dark Yellow** | 3.9y 6.0 6.4 | #B07D2B | |
| **89 Pale Yellow** | 4.7y 9.0 3.8 | #FFDB8B | |
| **90 Grayish Yellow** | 4.4y 7.2 3.8 | #CEA262 | |
| **91 Dark Grayish Yellow** | 3.8y 5.9 4.0 | #A47C45 | |
| **92 Yellowish White** | 4.5y 9.2 1.2 | #FFE2B7 | |
| **93 Yellowish Gray** | 3.8y 7.4 1.4 | #CAA885 | |
| **94 Light Olive Brown** | 2.1y 4.9 7.9 | #945D0B | |
| **95 Moderate Olive Brown** | 2.7y 3.6 5.5 | #64400F | |
| **96 Dark Olive Brown** | 2.0y 1.9 2.2 | #302112 | |
| **Greenish Yellow, Olive** | | | |
| **97 Vivid Greenish Yellow** | 9.1y 8.2 12.0 | #F4C800 | |
| **98 Brilliant Greenish Yellow** | 9.8y 8.8 9.5 | #FFDC33 | |
| **99 Strong Greenish Yellow** | 9.2y 7.2 9.2 | #CCA817 | |
| **100 Deep Greenish Yellow** | 9.2y 5.9 9.2 | #9F8200 | |
| **101 Light Greenish Yellow** | 9.8y 8.9 7.0 | #FFDE5A | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **102 Moderate Greenish Yellow** | 9.5y 7.1 6.5 | #C4A43D | |
| **103 Dark Greenish Yellow** | 9.4y 5.9 6.3 | #9B8127 | |
| **104 Pale Greenish Yellow** | 9.5y 9.0 4.2 | #FFDF84 | |
| **105 Grayish Greenish Yellow** | 9.0y 7.2 3.9 | #C4A55F | |
| **106 Light Olive** | 8.2y 5.1 5.6 | #846A20 | |
| **107 Moderate Olive** | 7.6y 3.8 5.4 | #5E490F | |
| **108 Dark Olive** | 8.9y 2.4 3.1 | #362C12 | |
| **109 Light Grayish Olive** | 7.85y 5.5 2.5 | #8B734B | |
| **110 Grayish Olive** | 8.0y 3.6 2.0 | #52442C | |
| **111 Dark Grayish Olive** | 9.7y 2.0 1.8 | #2B2517 | |
| **112 Light Olive Gray** | 6.9y 5.5 1.3 | #887359 | |
| **113 Olive Gray** | 8.1y 3.5 0.9 | #4D4234 | |
| **114 Olive Black** | 9.0y 1.1 0.9 | #121910 | |
| **Yellow Green, Olive Green** | | | |
| **115 Vivid Yellowish Green** | 5.4gy 6.8 11.2 | #93AA00 | |
| **116 Brilliant Yellow Green** | 4.9gy 8.2 9.1 | #CED23A | |
| **117 Strong Yellow Green** | 5.4gy 6.0 8.7 | #7F8F18 | |
| **118 Deep Yellow Green** | 7.4gy 4.2 7.1 | #425E17 | |
| **119 Light Yellow Green** | 5.0gy 8.4 5.6 | #DCD36A | |
| **120 Moderate Yellow Green** | 4.8gy 6.0 5.0 | #8B8940 | |
| **121 Pale Yellowish Green** | 3.4gy 8.7 2.4 | #F0D698 | |
| **122 Grayish Yellowish Green** | 4.4gy 6.0 2.3 | #90845B | |
| **123 Strong Olive Green** | 4.0gy 3.0 11.0 | #0A4500 | |
| **124 Deep Olive Green** | 4.0gy 1.5 11.0 | #142300 | |
| **125 Moderate Olive Green** | 5.7gy 3.6 4.8 | #434B1B | |
| **126 Dark Olive Green** | 8.0gy 2.2 3.6 | #232C16 | |
| **127 Grayish Olive Green** | 4.6gy 3.5 2.0 | #48442D | |
| **128 Dark Grayish Olive Green** | 5.4gy 2.0 1.8 | #27261A | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **129 Vivid Yellowish Green** | 1.1g 5.9 11.2 | #379931 | |
| **Yellowish Green** | | | |
| **130 Brilliant Yellowish Green** | 0.3g 7.7 8.6 | #8CCB5E | |
| **131 Strong Yellowish Green** | 0.4g 5.4 8.7 | #478430 | |
| **132 Deep Yellowish Green** | 0.9g 3.5 9.0 | #00541F | |
| **133 Very Deep Yellowish Green** | 10.0gy 1.5 11.0 | #002800 | |
| **134 Very Light Yellowish Green** | 0.2g 8.6 4.6 | #C6DF90 | |
| **135 Light Yellowish Green** | 0.7g 7.4 5.2 | #007BA7 | |
| **136 Moderate Yellowish Green** | 0.5g 5.5 4.8 | #657F4B | |
| **137 Dark Yellowish Green** | 0.6g 3.5 5.0 | #304B26 | |
| **138 Very Dark Yellowish Green** | 0.3g 1.8 4.3 | #132712 | |
| **Green** | | | |
| **139 Vivid Green** | 3.2g 4.9 11.1 | #007D34 | |
| **140 Brilliant Green** | 6.2g 6.5 8.3 | #47A76A | |
| **141 Strong Green** | 5.8g 4.4 8.7 | #006B3C | |
| **142 Deep Green** | 5.1g 3.0 8.1 | #004524 | |
| **143 Very Light Green** | 6.5g 7.8 4.9 | #98C793 | |
| **144 Light Green** | 6.0g 6.4 5.1 | #719B6E | |
| **145 Moderate Green** | 6.3g 4.5 5.1 | #386646 | |
| **146 Dark Green** | 6.6g 2.8 4.6 | #203A27 | |
| **147 Very Dark Green** | 8.0g 1.8 3.0 | #16251C | |
| **148 Very Pale Green** | 7.3g 8.8 1.9 | #D8DEBA | |
| **149 Pale Green** | 7.6g 6.4 1.7 | #8D917A | |
| **150 Grayish Green** | 8.8g 4.5 1.8 | #575E4E | |
| **151 Dark Greenish Yellowish Green** | 1.0bg 2.9 1.8 | #313830 | |
| **152 Blackish Green** | 10.0g 1.0 1.4 | #141613 | |
| **153 Greenish White** | 10.0g 9.2 0.8 | #F5E6CB | |
| **154 Light Greenish Gray** | 3.0g 7.5 0.9 | #BAAF96 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **155 Greenish Gray** | 7.5g 5.5 1.0 | #7A7666 | |
| **156 Dark Greenish Gray** | 1.5bg 3.5 0.9 | #45433B | |
| **157 Greenish Black** | 8.7g 1.0 0.7 | #181513 | |
| **Bluish Green** | | | |
| **158 Vivid Bluish Green** | 5.0bg 5.0 13.0 | #00836E | |
| **159 Brilliant Bluish Green** | 2.9bg 6.0 9.6 | #009B76 | |
| **160 Strong Bluish Green** | 4.6bg 4.5 8.5 | #006D5B | |
| **161 Deep Bluish Green** | 2.8bg 2.4 8.3 | #00382B | |
| **162 Very Light Bluish Green** | 4.4bg 8.3 4.6 | #A0D6B4 | |
| **163 Light Bluish Green** | 4.6bg 6.5 4.9 | #669E85 | |
| **164 Moderate Bluish Green** | 4.6bg 4.5 5.0 | #2F6556 | |
| **165 Dark Bluish Green** | 4.9bg 2.7 5.0 | #013A33 | |
| **166 Very Dark Bluish Green** | 3.6bg 1.2 4.0 | #001D18 | |
| **167 Vivid Greenish Blue** | 5.0b 5.0 13.0 | #007BA7 | |
| **Greenish Blue** | | | |
| **168 Brilliant Greenish Blue** | 4.6b 5.9 7.7 | #2A8D9C | |
| **169 Strong Greenish Blue** | 4.9b 4.5 8.4 | #00677E | |
| **170 Deep Greenish Blue** | 5.0b 5.0 13.0 | #007BA7 | |
| **171 Very Light Greenish Blue** | 4.0b 8.0 4.0 | #A3C6C0 | |
| **172 Light Greenish Blue** | 4.5b 6.5 5.4 | #649A9E | |
| **173 Moderate Greenish Blue** | 4.7b 4.5 5.2 | #30626B | |
| **174 Dark Greenish Blue** | 3.7b 2.7 5.0 | #003841 | |
| **175 Very Dark Greenish Blue** | 5.0b 1.5 3.6 | #022027 | |
| **Blue** | | | |
| **176 Vivid Blue** | 5.0b 5.0 14.0 | #007CAD | |
| **177 Brilliant Blue** | 1.6pb 5.9 9.4 | #4285B4 | |
| **178 Strong Blue** | 2.9pb 4.1 10.4 | #00538A | |
| **179 Deep Blue** | 2.8pb 2.5 7.9 | #002F55 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| **180 Very Light Blue** | 2.7pb 7.9 6.0 | #A6BDD7 |
| **181 Light Blue** | 1.6pb 6.4 6.9 | #6C92AF |
| **182 Moderate Blue** | 3.0pb 4.3 6.8 | #395778 |
| **183 Dark Blue** | 2.2pb 1.7 5.5 | #002137 |
| **184 Very Pale Blue** | 1.5pb 8.3 3.3 | #C1CACA |
| **185 Pale Blue** | 0.6pb 6.5 2.6 | #919192 |
| **186 Grayish Blue** | 0.2pb 4.2 3.0 | #4A545C |
| **187 Dark Grayish Blue** | 9.2b 2.7 2.0 | #2C3337 |
| **188 Blackish Blue** | 9.8b 1.3 1.5 | #161A1E |
| **189 Bluish White** | 9.2b 9.1 1.2 | #F9DFCF |
| **190 Light Bluish Gray** | 8.2b 7.5 1.0 | #BEADA1 |
| **191 Bluish Gray** | 8.9b 5.5 0.9 | #7D746D |
| **192 Dark Bluish Gray** | 0.3pb 3.6 1.1 | #464544 |
| **193 Bluish Black** | 9.6b 1.1 0.8 | #151719 |
| **Purplish Blue** | | |
| **194 Very Purplish Blue** | 7.8pb 2.0 12.5 | #20155E |
| **195 Brilliant Purplish Blue** | 7.3pb 5.1 9.0 | #62639B |
| **196 Strong Purplish Blue** | 8.0pb 4.0 10.9 | #474389 |
| **197 Deep Purplish Blue** | 7.8pb 1.5 8.0 | #1A153F |
| **198 Very Light Purplish Blue** | 7.4pb 7.6 5.2 | #BAACC7 |
| **199 Light Purplish Blue** | 7.3pb 6.0 6.5 | #837DA2 |
| **200 Moderate Purplish Blue** | 7.9pb 3.5 6.5 | #423C63 |
| **201 Dark Purplish Blue** | 8.0pb 1.3 4.3 | #1A162A |
| **202 Very Pale Purplish Blue** | 7.0pb 8.0 3.7 | #CBBAC5 |
| **203 Pale Purplish Blue** | 7.0pb 6.0 3.9 | #8A7F8E |
| **204 Grayish Purplish Blue** | 6.9pb 3.4 3.8 | #413D51 |
| **Violet** | | |
| **205 Vivid Violet** | 2.0p 5.0 14.0 | #884BAE |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **206 Brilliant Violet** | 9.9pb 5.1 9.4 | #755D9A | |
| **207 Strong Violet** | 0.2p 3.7 10.1 | #53377A | |
| **208 Deep Violet** | 1.1p 1.2 8.6 | #240935 | |
| **209 Very Light Violet** | 2.0p 8.5 7.0 | #EEBEF1 | |
| **210 Light Violet** | 0.5p 5.6 7.1 | #876C99 | |
| **211 Moderate Violet** | 1.4p 3.6 7.0 | #543964 | |
| **212 Dark Violet** | 1.4p 1.3 4.9 | #22132B | |
| **213 Very Pale Violet** | 9.7pb 7.9 3.7 | #D8B1BF | |
| **214 Pale Violet** | 1.3p 6.0 4.0 | #957B8D | |
| **215 Grayish Violet** | 1.2p 3.3 3.9 | #46394B | |
| **Purple** | | | |
| **216 Vivid Purple** | 6.0p 4.5 14.0 | #943391 | |
| **217 Brilliant Purple** | 6.0p 7.0 11.0 | #DD80CC | |
| **218 Strong Purple** | 6.5p 4.3 9.2 | #803E75 | |
| **219 Deep Purple** | 6.3p 2.7 9.1 | #531A50 | |
| **220 Very Deep Purple** | 5.0p 1.5 8.0 | #320B35 | |
| **221 Very Light Purple** | 6.5p 7.8 5.1 | #E3A9BE | |
| **222 Light Purple** | 6.2p 6.5 6.5 | #BA7FA2 | |
| **223 Moderate Purple** | 6.6p 4.5 7.1 | #7F4870 | |
| **224 Dark Purple** | 6.3p 2.8 4.9 | #472A3F | |
| **225 Very Dark Purple** | 6.9p 1.0 4.5 | #230D21 | |
| **226 Very Pale Purple** | 5.5p 8.2 3.2 | #E6BBC1 | |
| **227 Pale Purple** | 7.9p 6.4 3.1 | #AE848B | |
| **228 Grayish Purple** | 8.1p 4.5 2.7 | #72525C | |
| **229 Dark Grayish Purple** | 0.5rp 2.8 2.0 | #452D35 | |
| **230 Blackish Purple** | 0.8rp 0.9 1.6 | #1D1018 | |
| **231 Purplish White** | 2.5rp 9.0 0.8 | #FADBC8 | |
| **232 Light Purplish Gray** | 0.3rp 7.5 1.1 | #C8A99E | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **233 Purplish Gray** | 1.0rp 5.5 0.9 | #88706B | |
| **234 Dark Purplish Gray** | 1.0rp 3.6 1.0 | #564042 | |
| **235 Purplish Black** | 9.54p 0.9 0.6 | #1B1116 | |
| **Reddish Purple** | | | |
| **236 Vivid Reddish Purple** | 1.0rp 3.0 14.0 | #7E0059 | |
| **237 Strong Reddish Purple** | 1.3rp 4.4 10.2 | #9A366B | |
| **238 Deep Reddish Purple** | 1.0rp 2.8 9.5 | #641349 | |
| **239 Very Deep Reddish Purple** | 0.9rp 1.9 8.9 | #470736 | |
| **240 Light Reddish Purple** | 0.7rp 6.0 6.9 | #BB6C8A | |
| **241 Moderate Reddish Purple** | 0.8rp 4.5 7.0 | #8C4566 | |
| **242 Dark Reddish Purple** | 1.3rp 2.8 4.8 | #4F273A | |
| **243 Very Dark Reddish Purple** | 1.5rp 1.0 4.8 | #270A1F | |
| **244 Pale Reddish Purple** | 1.3rp 6.0 4.2 | #AC7580 | |
| **245 Grayish Reddish Purple** | 1.0rp 4.5 4.2 | #7D4D5D | |
| **Purplish Pink, Purplish Red** | | | |
| **246 Brilliant Purplish Pink** | 6.0rp 8.5 11.0 | #FF97BB | |
| **247 Strong Purplish Pink** | 5.6rp 6.8 9.0 | #F6768E | |
| **248 Deep Purplish Pink** | 4.4rp 6.0 12.2 | #EB5284 | |
| **249 Light Purplish Pink** | 4.6rp 8.0 5.5 | #FFA8AF | |
| **250 Moderate Purplish Pink** | 4.6rp 6.8 6.7 | #E28090 | |
| **251 Dark Purplish Pink** | 6.4rp 5.9 7.0 | #C76574 | |
| **252 Pale Purplish Pink** | 3.7rp 8.4 3.3 | #FDBDBA | |
| **253 Grayish Purplish Pink** | 3.7rp 7.0 3.5 | #CC9293 | |
| **254 Vivid Purplish Red** | 7.6rp 4.9 13.6 | #D5265B | |
| **255 Strong Purplish Red** | 7.3rp 4.4 11.4 | #B32851 | |
| **256 Deep Purplish Red** | 7.3rp 2.6 10.1 | #6F0035 | |
| **257 Very Deep Purplish Red** | 6.8rp 1.7 8.0 | #470027 | |
| **258 Moderate Purplish Red** | 7.1rp 4.5 9.0 | #A73853 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **259 Dark Purplish Red** | 7.1rp 2.7 6.0 | #5B1E31 | |
| **260 Very Dark Purplish Red** | 6.6rp 0.9 4.8 | #28071A | |
| **261 Light Grayish Purplish Red** | 7.8rp 5.9 4.2 | #B27070 | |
| **262 Grayish Purplish Red** | 7.0rp 4.5 5.1 | #8C4852 | |
| **263 White** | 2.5pb 9.5 0.2 | #FFC9D7 | |
| **264 Light Gray** | 6.7y 7.4 0.2 | #C2A894 | |
| **265 Medium Gray** | 3.3gy 5.4 0.1 | #817066 | |
| **266 Dark Gray** | 2.5pb 3.5 0.0 | #49423D | |
| **267 Black** | 2.5pb 0.8 0.0 | #131313 | |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้