



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของเชื้อ
แอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

Cultivation in Starch Hydrolysis Medium of Actinomycetes from salt field
and their Antimicrobial Activity

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญสุข

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของเชื้อ
แอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

Cultivation in Starch Hydrolysis Medium of Actinomycetes from salt field
and their Antimicrobial Activity

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของเชื้อแอคติโนมัยซีท
จากดินนาเกลือเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะ

ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2560

ชื่อ-สกุล ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญย์ สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (หัวหน้าโครงการ)
รศ.ดร.จิตติ ท่าไผ่ สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ผู้ร่วมวิจัย)

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ด้วยอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46 สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ 5 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นเกณฑ์ แล้วนำไอโซเลททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0.46, 3, 5 และ 7 มีเพียง 9 ไอโซเลทที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือที่ร้อยละ 9 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB 925 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเคลียร์โซนกว้างที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 22.14 มิลลิเมตร เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 พบว่าเมื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 8 ในอาหารเหลว ISP2 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 14 ไอโซเลทไม่พบการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ด้วยอาหาร Modified M-9 ผสม phenol red ร้อยละ 0.009 จากนั้นนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพโดยวิธีการทดสอบขั้นต้น (pre-test) พบว่า 9 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ได้ ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ได้บนเทคนิค agar disc diffusion

การศึกษาการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท 7 ไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ MDB1929 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.72%, MDB30310 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.69%, MDB40310 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces luteus* 99.79%, MDB3222 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.71%, MDB1228 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* 100.00%, MDB822 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* 100.00% และ MDB2029 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces tendae* 99.86% นอกจากนี้ไอโซเลทที่ MDB40310, MDB822 และ MDB2029 สามารถทนเกลือได้ที่ร้อยละ 9 อีกด้วย จึงสามารถจัดเป็นเชื้อที่สามารถทนเกลือปานกลางอีกด้วย

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท, ดินนาเกลือ, ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ, 16s rRNA, phylogenetic tree



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Cultivation in Starch Hydrolysis Medium of Actinomycetes from salt field and their Antimicrobial Activity

Researcher: Dr.Khanungkan Klanbut (Head Of Research project)

Assoc.Prof.Dr.Chitti Thawai (Co-researcher)

Faculty: Science **Department:** Biology

ABSTRACT

A total of 41 actinomycetes were isolated from salt field soil of Ban laem, Petchaburi using Starch casein agar (SCA) with 0.46% (w/v) NaCl. And they could be grouped into 5 groups based on morphological characteristics and cultured characteristics. The ability of NaCl utilization were examined by using SCA media supplemented with NaCl concentration along the gradients of 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 and 15 % (w/v) and found that almost of all isolates grown best between 0.46-7% and only 9 isolates could be grown at 9%. According to starch hydrolysis activity, isolate MDB925 gave the highest clear zone on ISP4 agar at 22.14 mm and had specific growth rate (μ) the best at pH 8, 4% NaCl and 37°C when culture in ISP2 broth. The activity of L-asparaginase on Modified M-9 with 0.009% phenol red of 14 isolates could not found. Furthermore, antimicrobial activity by Pre-test method found the inhibition zone of 9 isolates against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TIRTR 2374 and *Candida albicans* ATCC 90028 but the crude extractions and intracellular extractions were tested by agar disc diffusion method, the results showed that both of the extractions could not detect the inhibition zone.

The 16S rRNA gene sequence analyses indicated that 7 isolates which have interested morphological characterization; MDB1929 showing similarity with *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.72%, MDB30310 showing similarity with *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.69%, MDB40310 showing similarity with *Streptomyces luteus* 99.79%, MDB3222 showing similarity with *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.71%, MDB1228 showing similarity with *Streptomyces rochei* 100.00%, MDB822 showing similarity with *Streptomyces rochei* 100.00% และ MDB2029 showing similarity with *Streptomyces tendae* 99.86%. Furthermore, MDB40310, MDB822 and MDB2029 could grow on 9% NaCl concentration which could classify to be moderate halotolerance.

Keywords : Actinomycetes, Salt field soil, Antimicrobial activity, 16s rRNA, phylogenetic tree

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัย
ขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย (หัวหน้าโครงการ)
รศ.ดร.จิตติ ท่าไวย (ผู้ร่วมวิจัย)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 นาเกลือ	4
2.2 แหล่งผลิตเกลือในประเทศไทย	4
2.3 ฤดูกาลทำนาเกลือ	5
2.4 ชนิดของเกลือ	6
2.5 ประโยชน์ของนาเกลือ	7
2.6 แอคติโนมัชีท	7
2.7 สัตว์ฐานวิทยาของแอคติโนมัชีท	8
2.8 การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัชีทจากดินนาเกลือ	13
2.9 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
3.1 การเก็บตัวอย่างดิน	17
3.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัชีท	17
3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแอคติโนมัชีทที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน	18
3.5 การเตรียมสารละลายสปอร์	18
3.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท	18
3.7 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	19
3.8 การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบและอัตราการเจริญ	20
3.9 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase	21
3.10 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ	21
3.11 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	22
3.12 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	105
เอกสารอ้างอิง	109
ภาคผนวก	114
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	115
ภาคผนวก ข ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน	120
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5	123
ข้อมูลประวัติผู้วิจัย	124

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A	24
4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B	25
4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท	51
4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	57
4.5 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่ เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12, 15	59
4.6 ผลความสามารถการย่อยสลายแป้งของไอโซเลทต่างๆ	62
4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์ เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ที่ระดับค่าความเป็นกรด่าง (pH) ที่ต่างกัน	64
4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวน เป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ที่ระดับ ความเข้มข้น NaCl ที่ต่างกัน	68
4.9 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่ม จำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ที่ระดับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน	73
4.10 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	79
4.11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจาก เซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion	85
4.12 แสดงค่าความเข้มข้นของ DNA หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ววัดด้วยเครื่อง nano drop และแสดงตำแหน่งที่ทำการตัด (cut point)	95
4.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีท	96

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงภาพการทำนาเกลือที่บ้านแหลม	4
2.2 การกลั่นนาเกลือ เพื่อปรับสภาพหน้าดิน	6
2.3 แสดงภาพลักษณะของเกลือ	6
2.4 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน	8
2.5 การเจริญเป็นโคโลนีของแอคติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง โดยเกิดการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)	10
2.6 การสร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) ของแอคติโนมัยซีทสกุลต่างๆ	11
2.7 การสร้างสปอร์เป็นสายของแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ	12
2.8 การสร้างสปอร์สายยาวของ <i>Streptomyces</i> ในลักษณะต่างๆ	12
2.9 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Streptomyces</i> sp. ซึ่งยับยั้งการเจริญของ <i>E. coli</i> โดยวิธี Agar well diffusion	16
4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB31310	26
4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB548	27
4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB11210	28
4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3422	28
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3528	29
4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB925	29
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB148	30
4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2739	31
4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2839	31
4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB17310	32
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2029	33
4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB23310	33
4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2433	34
4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2639	34
4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB16310	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1829	36
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB21210	36
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB432	37
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB732	37
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB13310	38
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB14310	38
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB37310	39
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB38310	40
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB15310	40
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1929	41
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB22310	41
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2539	42
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2939	42
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB30310	43
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3222	44
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB3322	44
4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB40310	45
4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB4123	45
4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB822	46
4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB39310	46
4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB632	47
4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB36310	48
4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB2510	48
4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1025	49
4.40 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลขที่ MDB1228	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.41 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342	50
4.42 ผลความสามารถการย่อยสลายแป้งของไอโซเลทที่ MDB925 ที่มีการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดบนอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4)	62
4.43 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว ISP2 โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) คือ 7 (A), 8 (B), 9 (C) และ 10 (D)	65
4.44 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) คือ 7, 8, 9 และ 10	66
4.45 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) คือ 7, 8, 9 และ 10	66
4.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว ISP2 โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0 (A), 0.5 (B), 1 (C) และ 2 (D)	69
4.47 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6	71
4.48 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6	71
4.49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว ISP2 โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 (A), 37 (B) และ 45 (C) องศาเซลเซียส	74
4.50 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส	75
4.51 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส	75
4.52 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 14 สายพันธุ์	77

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.53 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด	78
4.54 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท ที่ MDB148 (ก), ไอโซเลทที่ MDB822 (ข) และ ไอโซเลทที่ MDB13310 (ค)	83
4.55 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท ที่ MDB39310 (ก), ไอโซเลทที่ MDB16310 (ข) และ ไอโซเลทที่ MDB17310 (ค)	83
4.56 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท ที่ MDB342 (ก), ไอโซเลทที่ MDB925 (ข) และ ไอโซเลทที่ MDB1228 (ค)	83
4.57 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> 25922	90
4.58 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
4.59 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>	91
4.60 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	92
4.61 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i>	93
4.62 แสดงภาพผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i>	93
4.63 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 9F และ 1541R	94
4.64 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1929	96
4.65 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1929	97
4.66 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB30310	97
4.67 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB30310	98
4.68 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB40310	98
4.69 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB40310	99
4.70 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB3222	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.71 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB3222	100
4.72 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB1228	101
4.73 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB1228	101
4.74 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB822	102
4.75 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB822	103
4.76 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2029	104
4.77 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท MDB2029	104
ก แสดงภาพลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 ดิน A	120
ข แสดงภาพลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 ดิน B	120
ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-10	121
ง แสดงภาพจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-10	122

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย

การผลิตเกลือในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคกลางของประเทศไทย ถือว่าเป็นมรดกทางวัฒนธรรมที่สำคัญของไทย การทำนาเกลือจะต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ มีภูมิประเทศเป็นที่ราบ มีพื้นที่ติดกับทะเล ดินต้องมีลักษณะเป็นดินเหนียว เพื่อช่วยรักษาระดับน้ำได้ดี และทำการชลประทานน้ำทะเลเข้ามายังนาเกลือ หลังจากนั้นความร้อนจากดวงอาทิตย์จะระเหยน้ำขึ้นไป จึงทำให้เกิดผลึกของเกลือที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Sintusaard, 2009) แอคติโนมัยซีทคือ จุลินทรีย์ประเภท Prokaryotes (Moncheva *et al.*, 2003) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ใช้ออกซิเจนในการเจริญ จัดอยู่ใน Order Actinomycetales มีการสร้างเส้นใยคล้ายรา (Chaudhary *et al.*, 2013) สามารถพบได้ทั้งบนบกและในน้ำ ผลิต Secondary metabolite ซึ่งมีความหลากหลายทางการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถนำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ, ระบุภูมิคุ้มกัน และเป็นสารต้านมะเร็ง (Selesteen *et al.*, 2013) สารพันธุกรรมของแอคติโนมัยซีทจะประกอบไปด้วยเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C) 57-75% (Jeffrey *et al.*, 2008) เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่มากมายในธรรมชาติ โดยส่วนมากจะอาศัยอยู่ในดิน (Pandey *et al.*, 2011) โดยสามารถแบ่งออกเป็น Acidophilic actinomycetes, Alkaliphilic actinomycetes, Psychrophilic actinomycete, Thermophilic actinomycetes, Halophilic actinomycetes, Haloalkaliphilic actinomycetes และ Xerophilic actinomycetes (Meklat *et al.*, 2011) แอคติโนมัยซีทที่อยู่ในดินนาเกลือ จะมีกระบวนการ Metabolism และสรีระวิทยาที่ต่างไปจากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์อื่นที่เจริญในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน (Hamedi *et al.*, 2013) โดยที่จะมีความสามารถในการทนต่อโซเดียม-คลอไรด์ และความเป็นกรดด่างสูง (Selesteen *et al.*, 2013) เนื่องจากมีความดันในเซลล์ค่อนข้างสูง จึงทำให้อยู่รอดภายใต้ดินที่มีความชื้นต่ำ และความเค็มสูงได้ นอกจากนี้เกลือยังมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการ Metabolism ของเซลล์ ซึ่งแอคติโนมัยซีทจำพวกที่สามารถดำรงชีวิตในนาเกลือ ได้แก่ Alkaliphilic actinomycetes จะอยู่ในดินที่มีสภาวะเป็นด่าง, Halophilic actinomycetes และ Haloalkaliphilic actinomycetes จะอยู่ในดินที่มีสภาวะเป็นเกลือ โดยที่ Alkaliphilic actinomycetes สามารถเจริญได้ดีในความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 10-11 ไม่สามารถเจริญได้ในความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 7 และสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10 แต่ Haloalkaliphilic actinomycetes สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 (Zenova *et al.*, 2010) Halophilic actinomycetes สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10-20 หรือ ร้อยละ 15-25 (Zvyagintsev *et al.*, 2009) อาหาร Starch casein agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในดิน (Arifuzzaman *et al.*, 2010) และอาหาร Yeast extract-Malt extract (ISP2) เป็นอาหารที่ใช้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา, คุณลักษณะการเจริญของเชื้อ, วิเคราะห์สีของเส้นใยอาหาร และ เส้นใยอากาศ (Franco-Correa *et al.*, 2010) เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟิโนไทป์จะสามารถจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ที่ร้อยละ 6 ความเป็นกรดค่าที่ 4-9 จะสามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเทาเข้มอมม่วง เส้นใยอากาศเป็นสีขาว มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเทาหม่นกอก สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว

กลุ่มที่ 2 เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ที่ร้อยละ 4 ความเป็นกรดค่าที่ 5-9 จะสามารถสร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร

กลุ่มที่ 3 เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ที่ร้อยละ 5 ความเป็นกรดค่าที่ 4.5-9 จะสามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองจนถึงส้มเข้ม มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเหลือง-อ่อน มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองสว่าง สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเส้นตรงบนเส้นใยอาหาร (จิตติ, 2553)

สารอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่ช่วยในการเจริญของ Actinomycetes โดย Actinomycetes สามารถใช้สารอาหารได้หลากหลาย เช่น กลูโคส, แป้ง, โปรตีน และกรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม bacteria อื่นๆ ที่ใช้ได้เพียงสารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนบางตัวเท่านั้น (Malek *et al.*, 2014) สารประกอบที่ Actinomycetes ไม่สามารถนำมาเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนได้เช่น carbon dioxide, D-fucose, melezitose, inulin, cellulose, mucate, formate เป็นต้น (Prosser and Palleroni, 1978)

สำหรับการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแอคติโนมัยซีทซึ่งมีจีโนมเป็นแฮพลอยด์ (Lederberg, 2000) โดยเลือกทำการศึกษาแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อที่จะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งมีความสำคัญในการช่วยจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทออกจากกันได้ ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะสามารถระบุได้ว่า ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทมีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา, ลักษณะทางเคมี และลักษณะทางกายภาพ อีกทั้งทำให้ทราบความสัมพันธ์ของ แอคติโนมัยซีทในรูปของ Phylogenetic tree ได้อีกด้วย (Whitman *et al.*, 2011)

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาแอคติโนมัยซีทจากบริเวณดินนาเกลือ โดยคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ นำมาศึกษาหาอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลตต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของแป้งเป็นส่วนประกอบ และศึกษาค่าความเข้มข้นของเกลือ, ความเป็นกรดค่า และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน อีกทั้งศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ของแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้

และศึกษาการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากการศึกษาทั้งหมดเพื่อมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทที่อยู่ในดินนาเกลือ และสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาและคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ และกำหนดหมายเลขไอโซเลท ทำการวิเคราะห์หาอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของแป้งเป็นส่วนประกอบอีกทั้งการใช้แป้งทดแทนสารอาหารอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยประหยัดต้นทุนการเพาะเลี้ยงในอุตสาหกรรมอีกด้วย ที่มีค่าความเข้มข้นของเกลือ, ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และศึกษาการผลิตเอนไซม์ L-asparaginase ของแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ และสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน การวิเคราะห์หาอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของแป้งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Inorganic salts-starch agar (ISP4) ทราบถึงความแตกต่างในการเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ, ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และศึกษาการผลิตเอนไซม์ L-asparaginase สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ของแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้ รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือจากตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน ดิน การวิเคราะห์หาอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของแป้งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Inorganic salts-starch agar (ISP4)
3. ทราบถึงความแตกต่างในการเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ, ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน
4. เพื่อศึกษาถึงสารสกัดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ
5. เพื่อศึกษาการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาเกลือ

วัฒนธรรมการทำนาเกลือหรือการผลิตเกลือสมุทรนับได้ว่า เป็นวัฒนธรรมประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสังคมไทย เนื่องจากการประกอบอาชีพการทำนาเกลือเป็นส่วนหนึ่งของวิถีชีวิตของผู้คนที่อาศัยอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำเค็มที่ได้สืบกันมานานนับร้อยปี จนมีการออกพระราชกฤษฎีกากำหนดอาชีพและวิชาชีพไว้สำหรับเฉพาะคนไทย เมื่อ ๒๔๗๒ ในสมัยรัฐบาลจอมพล ป. พิบูลสงคราม โดยได้กำหนดให้อาชีพทำนาเกลือเป็นอาชีพที่รัฐบาลสงวนไว้สำหรับคนไทยโดยเฉพาะ ดังนั้นอาชีพการทำนาเกลือจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อคนไทยและสังคมไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ (ปิ่นนิตร์, 2553)

นาเกลือเป็นพื้นที่สำหรับผลิตเกลือ คล้ายนาข้าวแต่ไม่ได้ปลูกพืช มีมากในบริเวณพื้นที่ติดทะเล การทำนาเกลือ ถือเป็นอาชีพที่ต้องอาศัยภูมิปัญญา ประสบการณ์ และการสังเกตร่วมกับการพึ่งพาอาศัยธรรมชาติ โดยพื้นที่ที่เหมาะสมกับการทำนาเกลือ นั้น นอกจากเป็นพื้นที่ที่ติดริมชายฝั่งทะเลแล้ว ลักษณะภูมิประเทศต้องเป็นที่ราบลุ่ม และที่สำคัญคือดินต้องเป็นดินเหนียว อุ้มน้ำได้ดี โดยเกลือสำหรับนักเคมีแล้วอาจหมายถึงสารประกอบไอออนิกที่เกิดจากโซเดียมซึ่งเป็นไอออนบวกมาสร้างพันธะทางเคมีร่วมกับคลอไรด์ที่เป็นไอออนลบ ที่เรียกว่า เกลือแกง หรือ โซเดียมคลอไรด์ แต่สำหรับในวิถีชีวิตของมนุษย์แล้ว เกลือคือผลึกสีขาวที่มากด้วยคุณค่า ทั้งการเป็นเครื่องปรุงรส วัตถุดิบในการถนอมอาหารและมีสรรพคุณทางยา (สุภาพรณ, 2556)



การขนานาเกลือบ้านแหลม

รูปที่ 2.1 แสดงภาพการทำนาเกลือที่บ้านแหลม ที่มา : <http://www.paiduaykan.com>

2.2 แหล่งผลิตเกลือในประเทศไทย (การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย, 2555)

แหล่งผลิตเกลือทะเลที่สำคัญของประเทศไทยตั้งแต่สมัยโบราณ ได้แก่ จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี การทำนาเกลือทะเลหรือเกลือสมุทรใช้พื้นที่ประมาณ 30-40 ไร่ขึ้นไปโดยอาศัยแสงแดดช่วยเพิ่มความเค็มให้กับน้ำทะเลจนตกผลึกเป็นเม็ดเกลือ การทำนาเกลือจึงเป็นภูมิปัญญาที่ต้องพึ่งพาสายลม แสงแดด และคนเดินน้ำ ส่วนเกลือสินเธาว์ใช้วิธีการนำน้ำใต้ดินมาต้ม ซึ่งมีแหล่งผลิตใหญ่อยู่ในภาคอีสาน สมุทรสาคร เป็นต้นกำเนิดแห่งการทำนาเกลือ ชาวตำบล บางโทรัด จังหวัด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมุทรสาคร คือคนทำนาเกลือกลุ่มแรกค้นพบโดยบังเอิญว่าดินเลนที่เค็มจัด มีเนื้อดินที่เหนียวจนกระทั่งน้ำไม่สามารถซึมผ่านได้ คือคุณสมบัติเด่นที่เอื้อต่อการทำนาเกลือ หลังจากนั้นจึงเริ่มทำเป็นอาชีพและขยายวงกว้างไปแถบ บางหญ้าแพรก นาโคก บ้านบ่อ บางกระเจ้า ซึ่งล้วนเป็นตำบลที่มีเขตพื้นที่ติดกับชายทะเล ส่วนเพชรบุรี เป็นแหล่งที่ทำนาเกลือเยอะที่สุด โดยเฉพาะในเขตอำเภอบ้านแหลม เป็นแหล่งผลิตเกลือสมุทรที่สำคัญ และถือว่าเกลือจากเพชรบุรีดีที่สุดจากจำนวน 4 แห่งของเมืองไทย ลักษณะของพื้นที่ทำนาเกลือที่เหลืออยู่ในปัจจุบัน นอกจากจะต้องอยู่ติดทะเลเพื่อใช้น้ำทะเลเป็นแหล่งทรัพยากรแล้ว ด้านหนึ่งของพื้นที่ยังต้องอยู่ใกล้ถนนหรือลำคลอง เพื่อความสะดวกในการขนส่งผลผลิต

2.3 ฤดูกาลทำนาเกลือ

การทำนาเกลือในภาคกลางจะเริ่มในช่วงฤดูแล้งตั้งแต่ต้นเดือนพฤศจิกายน ถึงประมาณกลางเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ระยะเวลาประมาณ 6-7 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศเนื่องจากการทำนาเกลือไม่สามารถทำได้ในช่วงฤดูฝน และจะเริ่มเก็บผลผลิตเกลือได้ประมาณกลางเดือนมกราคม เป็นต้นไป สำหรับการทำนาเกลือในภาคใต้ ที่จังหวัดปัตตานี มีระยะเวลานานกว่าภาคกลางโดยสามารถผลิตได้ปีละ 2 ครั้ง ครั้งแรกเริ่มประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน ประมาณ 5 เดือน และครั้งที่สองเริ่มประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน ประมาณ 3 เดือน รวมมีช่วงการผลิตประมาณ 8 เดือน ส่วนในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม จะมีฝนตกชุกไม่สามารถทำนาเกลือได้ (สุกาญจน์, 2013) โดยระยะเวลาการทำนาเกลือจะมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 แรม 8 ค่ำ เดือน 11 บวงสรวงทำพิธีแรกนาหรือทำขวัญนา หลังเทศกาลออกพรรษาราว 1 อาทิตย์ เมื่อทำพิธีแรกนาถวายหัวหมู ส้มสุก ลูกไม้ ถั่วลิสงคาวหวาน และดอกไม้ธูปเทียน หลังจากนั้น คนทำนาเกลือจะเริ่มปรับปรุงคันนาโดยใช้พลั่ว เพื่อเปิดทางระบายน้ำจนท้องนาแห้งสนิท

2.3.2 ขึ้น 1 ค่ำ เดือน 12 เริ่มเข้าสู่กระบวนการจัดการน้ำ จะเริ่มผันน้ำจากนาประเทียบ (วังน้ำ) เพื่อลาดนา แล้วปล่อยทิ้งไว้ 1 อาทิตย์ จนความเค็มของน้ำขึ้นไปที่ระดับ 10 ดิกรี

2.3.3 ขึ้น 8 ค่ำ เดือน 12 ถอดนา คือถอดน้ำจากนาประเทียบขึ้นไปพักไว้ยัง “นาเชื้อ” เพื่อตากแดดเพิ่มดิกรีความเค็มของน้ำประมาณ 7 วัน

2.3.4 ขึ้น 15 ค่ำ เดือน 12 เตรียมกลิ้งนาท้องกลิ้ง ระหว่างที่พักน้ำไว้ในนาเชื้อ ชาวนาเกลือจะกลิ้งนาท้องกลิ้งจนท้องเหนียวและแห้งสนิท แล้วตากทิ้งไว้อีก 3 วัน เพื่อให้ท้องนาระอบ

2.3.5 แรม 3 ค่ำ เดือน 12 เดินน้ำเข้าสู่ท้องกลิ้ง ผันน้ำจากนาประเทียบมาใส่ท้องกลิ้ง พักน้ำไว้ 5 วัน จนกว่าน้ำจะมีความเค็มสูงถึง 20 ดิกรี เพื่อช่วยให้น้ำท้องกลิ้งซึ่งจะถูก เปลี่ยนไปเป็น “นาปลง” เกิดความฉุน (อมความเค็มมากขึ้น)

2.3.6 แรม 8 ค่ำ เดือน 12 ถอดน้ำจากนาท้องกลิ้ง ชาวนาจะค่อยๆ ถอดน้ำจากนาท้องกลิ้งไปพักไว้ในนาเชื้อต่อ 3 วัน รอจนน้ำเค็มจัดถึง 23 ดิกรี

2.3.7 แรม 12 ค่ำ เดือน 12 เริ่มลงมือกลิ้ง “นาปลง” ระหว่างพักน้ำรอบที่ 2 ชาวนาเกลือ จะกลิ้งนาท้องกลิ้งเพื่อเตรียมให้เป็น “นาปลง” ราวสี่ห้าตลบจนกว่าท้องนาจะเหนียวแน่นและแข็ง ชนิดที่ว่าหากขย่ำลงไปจะไม่ปรากฏรอยเท้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8 ขึ้น 1 ค่ำ เดือน 1 ปลงนาปลง ถอดน้ำจากนาเชือกที่บ่มไว้จนความเค็มได้ 23 ดิกรีเข้าไปยัง “นาปลง” ผ่านทาง “หุนา” บ่มด้วยความร้อนจากดวงอาทิตย์ เพียง 10-15 วันให้หลัง พื้นที่ทุกตารางนิ้วของนาปลงก็จะขาวโพลนไปด้วยผลึกเกลือบริสุทธิ์

2.3.9 ขึ้น 15 ค่ำ เดือน 1 ร่อนนา เมื่อผลึกเกลือหนาเท่าฝ่ามือจึง “ร่อนนา” โดยใช้พลั่วขอย อิฐนสะทาจักแฉว และเสทาสู่เกลือ สุ่มเกลือเป็นกองสามเหลี่ยมเรียงเป็นแถว ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วันให้น้ำแห้งสนิท หลังจากนั้นขานาเกลือจึงหาบใส่ยุ้ง



รูปที่ 2.2 การกลั่นนาเกลือ เพื่อปรับสภาพน้ำดิน ที่มา: <http://www.manager.co.th>

2.4 ชนิดของเกลือ (การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย, 2555)

เกลือมีสองชนิดคือ เกลือสมุทรหรือเกลือแกง เกิดจากกระบวนการผลิตแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน ที่อาศัยการหมุนเวียนน้ำในนาเกลือที่ต่างระดับ ผลึกเกลือจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อคนเดินน้ำทำงานสัมผัสกับสายลม แสงแดด เกลือสมุทรมีแหล่งผลิตใหญ่อยู่ที่ จังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร และเพชรบุรี เกลือชนิดนี้มีสารไอโอดีนผสมอยู่ด้วยตามธรรมชาติ

เกลือสินเธาว์ เป็นเกลือที่ได้จากการนำน้ำใต้ดินมาต้มหรือตาก ซึ่งส่วนใหญ่ทำกันในภาคอีสาน ถึงหน้าต้มเกลือตามแหล่งเกลือจะเป็นที่ชุมนุมของคนในท้องถิ่น งานต้มเกลือต้องอยู่กลางแจ้งและความร้อนจากเตาไฟตลอดวัน แต่เกลือที่ต้มนั้นจะเป็นเกลือที่มีคุณภาพดีที่สุดจะนำมาทำปลาร้า ปลาซำได้ดี ไม่เน่า และเป็นเกลือที่มีรสฉ่ำ (กลมกล่อม) มีกลิ่นหอมดิน



รูปที่ 2.3 แสดงภาพลักษณะของเกลือ ที่มา : <http://www.goodlifeupdate.com>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ประโยชน์ของนาเกลือ

2.5.1 ช่วงฤดูฝนชาวนาเกลือจะได้เกลือจืด (ยิปซัม) ซึ่งเป็นผลึกสารแคลเซียมซัลเฟต ที่เหลืออยู่ในเกลือหลังจากที่ตักเกลือออกไปจากนาเกลือจนหมดแล้ว ซึ่งชาวนาเกลือจะชูดอกเกลือก่อนที่จะปล่อยน้ำทะเลเข้ามาเพื่อทำการรอบใหม่ (สุภาพรณ, 2556) เกลือจืดมีคุณสมบัติช่วยลดความชื้นและผดผื่นคัน เกลือจืดที่ดีต้องสะอาดไม่มีดินปน กระบวนการเก็บเกลือจืดจากนานั้น เกลือจืดควรมีอายุ 2 ปี เกิดผลึกใหญ่กำลังพอดีไม่มีดินมาปะปน ชาวนาเกลือจึงเก็บเกลือจืดเพียงปีเว้นปี และเก็บโดยค่อยๆกวาดเนื้อเกลือจากผิวดิน ไม่เช่นนั้นเศษดินจะคลุกงอใน แยกออกเป็นเกลือจืดบริสุทธิ์ได้ยาก (รพีภัทร์ และคณะ, 2557)

2.5.2 ช่วงฤดูร้อนในนาเกลือจะมีดอกเกลืออยู่ตามขอบคันนา ดอกเกลือเกิดขึ้นเมื่อแดดและลมทำให้น้ำในนาเกลือเริ่มระเหย จับตัวเป็นผงเล็กๆ เกาะกันเป็นแพลอยอยู่ที่ผิวน้ำ ดอกเกลือมีคุณสมบัติช้อนเร็นนอกเหนือไปจากเรื่องรสชาติ ก็คือเกี่ยวกับผิวพรรณ รักษาผิวแห้ง ทำชาวน้ำ ทำสปา (รพีภัทร์ และคณะ, 2557; อัมพร, 2556)

2.5.3 ดิเกลือ การทำดิเกลือจะทำให้แปลงเฉพาะ ไม่ปนกับแปลงนาเกลือ โดยนำน้ำจาก การรื้อเกลือแต่ละครั้งไปขังรวมกันไว้ ทั้งไว้ระยะหนึ่งก็จะมีดิเกลือขึ้นเกาะอยู่ตามพื้นนา เกษตรกรชาวนาเกลือจะเก็บดิเกลือทุกวันในเวลาเช้าก่อนแดดออก (ถ้าแดดจัดเกลือจะละลายไปกับน้ำ) ดิเกลือชนิดนี้จะเป็นเม็ดสีขาวมีรสขม นำไปใช้ประกอบเป็นเครื่องยาไทยโบราณประเภทยาละลายหรือยาถ่าย และน้ำที่อยู่ในนา ดิเกลือจะมีความเค็มจัดมาก เรียกว่า “น้ำดิเกลือ” นำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการทำเต้าหู้ เป็นสารทำให้เต้าหู้แข็งตัว

2.5.4 จีแดด เป็นส่วนที่อยู่บนผิวดินของเกลือ มีลักษณะเป็นแผ่นร่อนอยู่บนผิวนา ซึ่งเกษตรกรชาวนาเกลือต้องทำการเก็บจีแดดก่อนทำการบดดิน ตอนต้นฤดูการทำนาเกลือ จีแดดนี้สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยปลูกพืชได้

2.5.5 สัตว์น้ำทะเลต่างๆ เกษตรกรชาวนาเกลือที่มีพื้นที่กักเก็บน้ำทะเล (วัง) ก็จะมีสัตว์น้ำทะเลต่างๆ เช่น กุ้งขาว กุ้งแช่เบ๊ว ปลาหมอเทศ ปลากะพง ปูทะเล ฯลฯ อยู่ภายในวัง เป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบธรรมชาติเพื่อเป็นรายได้เสริมทางหนึ่ง (สุภาพรณ, 2556)

2.6 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ จัดอยู่ในอันดับ *Actinomycetales* โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ตั้งแต่รูปร่างกลม เป็นท่อน และมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา (Miyadoh, 1997) ซึ่งเส้นใยที่สร้างมี 2 ประเภท คือ เส้นใยที่เจริญลงไปได้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้ (asexual spore) ซึ่งจะสร้างเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่มีลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากเชื้อราคือ แอคติโนมัยซีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทจะมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร (Teja *et al.*, 2014) เชื้อแอคติโนมัยซีทมีลักษณะจำเพาะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น คือ มีปริมาณของเบสกวานีนและไซโตซีนสูงมากกว่าร้อยละ 55 ของปริมาณสารพันธุกรรม (Doroghazi and Metcalf, 2013) นอกจากนี้โคโลนีจะมีลักษณะคล้ายผงแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) ไม่มันวาว โดยเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง เส้นใยอาหารจะแทงลงในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมา มีการสร้างเส้นใยขึ้นบนอากาศ ทำให้กลุ่มของเส้นใยอัดตัวแน่น เกิดเป็นโคโลนีที่มีขอบเขตชัดเจน

เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม อากาศ เนื้อเยื่อพืช โดยส่วนใหญ่จะพบในดิน ตั้งแต่ดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ดินป่าชายเลน ดินเพาะปลูกทำการเกษตร สกุนต์ที่พบมากที่สุด คือ *Streptomyces* ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile ทำให้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส บางชนิดเป็นพวก psychrophile และ thermophile ดำรงชีวิตโดยการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไคติน รวมทั้งลิกนิน และดูดซึมสารอินทรีย์จากดินเป็นแหล่งอาหาร สามารถสร้างสารจีโอสมิน (geosmin) ได้ ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทยังสามารถผลิตเนอโอสไมน์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในอุตสาหกรรม รวมทั้งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส สารต้านมะเร็ง เป็นต้น (Procópio et al., 2012)



รูปที่ 2.4 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน

2.7 ลักษณะวิทยาของแอคติโนมัยซีท

2.7.1 เส้นใยของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับเชื้อรา แต่เส้นใยของแอคติโนมัยซีทมีขนาดเล็กกว่าของเชื้อรา ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.5 ถึง 0.8 ไมโครเมตร โดยเส้นใยที่แอคติโนมัยซีทสร้าง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

- 1) เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) เป็นเส้นใยที่เจริญลงในเนื้อวุ้นของอาหารแข็ง ช่วยนำสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเข้าสู่เซลล์ โดยช่วงต้นของการเจริญเส้นใยประเภทนี้จะมีสีขาวหรือครีม เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลายเป็นสีต่างๆ เช่น เหลือง ส้ม ชมพู แดง หรือน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอาหารจะเจริญอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง ต่อมา มีการพัฒนาเป็นเส้นใยเอกซาร์ซึ่งเป็นเอกซาร์ที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

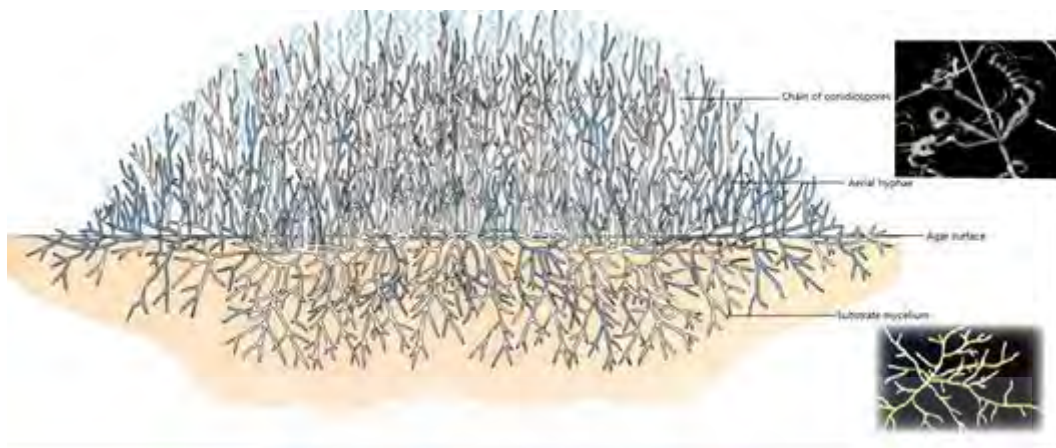
ที่ยาว และเส้นใยที่ซับซ้อนที่สุดในที่สุด โดยเส้นใยอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 ไมโครเมตร (Manteca *et al.*, 2005)

2) เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เป็นเส้นใยที่งอกขึ้นบนอากาศ เจริญเหนือผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใยชนิดนี้ โดยเฉพาะใน *Streptomyces* แต่บางสกุล เช่น ใน *Frankia* ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แอคติโนมัยซีทแต่ละสปีชีส์จะมีสีและลักษณะของเส้นใยอากาศแตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทได้ ในสกุลที่สร้างเส้นใยชนิดนี้เจริญปกคลุมโคโลนี จะทำให้โคโลนีมีลักษณะคล้ายผงแป้ง นอกจากนี้เส้นใยอากาศยังมีคุณสมบัติเป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ มีการแตกแขนงน้อยกว่า แต่มีสีเข้มกว่าเส้นใยอาหาร และสามารถพัฒนาไปเป็นสปอร์ต่อไปได้ โดยเส้นใยอากาศของแอคติโนมัยซีทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 จนถึง 1.4 ไมโครเมตร (จามจุรีและคณะ, 2555)

ทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอคติโนมัยซีท มักมีการสร้างผนังกัน และเจริญยึดออกจากปลายของเส้นใย มีความหนาประมาณ 0.4 จนถึง 1.2 ไมโครเมตร ประกอบด้วยผนังเซลล์ ถัดมาเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ห่อหุ้มไซโทพลาซึมไว้ ภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วย ออร์แกเนลล์คือไรโบโซม สารพันธุกรรม ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ตลอดจนสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน ได้แก่ ไขมัน โพลีฟอสเฟต และโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังอาจพบมีโซโซมเชื่อมต่อกับส่วนของผนังเซลล์ด้วย

2.7.2 ลักษณะของโคโลนี

โคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีลักษณะจำเพาะ และแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เนื่องจากโคโลนีของแอคติโนมัยซีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใยอย่างหนาแน่น เกิดเป็นโคโลนีที่มีขอบเขตชัดเจน โดยเส้นใยบางส่วนจะฝังลงในเนื้อวุ้นของอาหารแข็ง สำหรับการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซีทจะเริ่มจากการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่เกิดการแตกหัก หรือบางส่วนของโคโลนีเดิมเหล่านี้ จะเจริญเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระยะนี้โคโลนีจะมีผิวเรียบ และพัฒนาเป็นเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยโคโลนีของแอคติโนมัยซีทมักเจริญออกจากศูนย์กลางในลักษณะรัศมี (Li *et al.*, 2016) ต่อมาจะมีการเปลี่ยนแปลงของโคโลนี ได้แก่ การสร้างสปอร์ การสร้างผนังกันของเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยทั้งสองประเภทมักจะมีการสร้างผนังกัน ขั้นตอนการสร้างและเจริญเป็นโคโลนีของแอคติโนมัยซีทแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การเจริญเป็นโคโลนีของแอคตินอมัยซีทบนอาหารแข็ง โดยเกิดการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

ที่มา: Li et al., (2016)

โคโลนีของแอคตินอมัยซีทมีความหลากหลาย โดยแต่ละสปีชีส์มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ใน *Sporichthya* มีการสร้างเส้นใยอากาศสั้นๆ ทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นส่วนของเส้นใยที่เจริญฝังลงในเนื้อวุ้นของอาหารแข็ง ส่วนใน *Micromonospora*, *Actinoplanes* และ *Salinispora* มีการสร้างเส้นใยอาหาร แต่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่โดยทั่วไปโคโลนีของแอคตินอมัยซีทมักมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ เช่น ใน *Streptomyces* มีการสร้างทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ (Wildermuth, 1970) โคโลนีอาจนูน (raise) หรือแบน (flat) และ มีลักษณะคล้ายหนัง (leather) มีระดับความแข็งตั้งแต่นุ่มมาก เหนียว ไปจนถึงแข็ง ผิวของโคโลนีอาจเรียบ (smooth) ขรุขระ (rough) เป็นผงคล้ายแป้ง (powder) หรือเป็นเม็ด (granular) สีของโคโลนีมีหลากหลาย เช่น สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ฟ้า ม่วง น้ำตาล และดำ ส่วนขนาดโคโลนีของแอคตินอมัยซีทขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สปีชีส์ อายุ และสภาวะในการเจริญ โดยขนาดของโคโลนีมีความแตกต่างกัน มีตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีตั้งแต่ระดับมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Dunca et al., 2006)

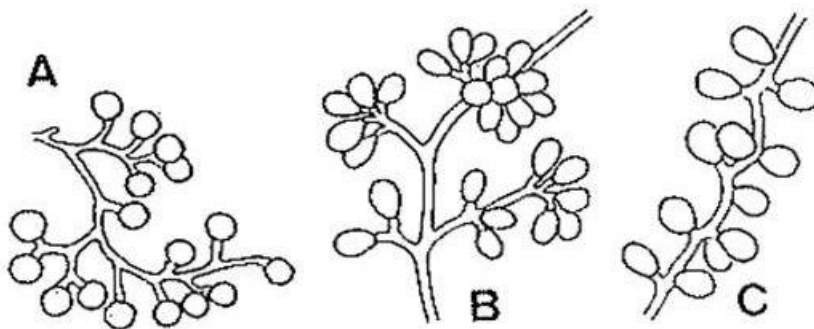
2.7.3 ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอคตินอมัยซีท

แอคตินอมัยซีทสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ การสร้างสปอร์เดี่ยว สปอร์เป็นสาย และสปอร์ในอับสปอร์ ตามลักษณะของโครงสร้างภายนอก

1) กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous)

การสร้างสปอร์เดี่ยว พบได้ในแอคตินอมัยซีทหลายสกุล เช่น ใน *Micromonospora* ส่วนของก้านชูสปอร์ (sporophore) จะเกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สร้างสปอร์ดิจอยู่พื้นฐาน โดยการสร้างสปอร์เริ่มจากเส้นใยเกิดการพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกันระหว่างก้านชูสปอร์กับส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้างผนังสปอร์ให้มีความหนาขึ้น ส่วนใน *Thermomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง หากแตกแขนงจะทำให้เกิดกลุ่มสปอร์ และใน *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่บริเวณปลายเส้นใยอากาศ (ศิริรัตน์, 2552) การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอคตินอมัยซีทสกุลต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 การสร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) ของแอคติโนมัยซีทสกุลต่างๆ

(A) *Microomonospora* (B) *Thermomonospora* (C) *Saccharomonospora*

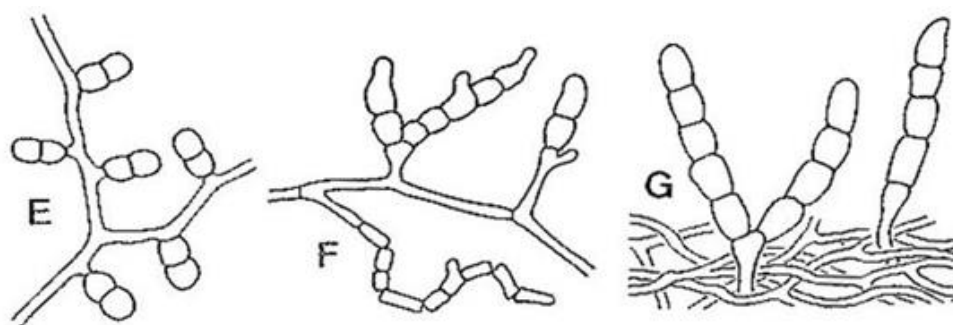
ที่มา: Li *et al.*, (2016)

2) กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย

การสร้างสปอร์เป็นสาย เกิดจากการที่เส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ต่อมาแต่ละ segment สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้พบได้มากในแอคติโนมัยซีท โดยสามารถแบ่งกลุ่มของสายสปอร์ จากจำนวนหรือความยาวของสปอร์ ได้แก่ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

2.1) สปอร์คู่ (bisporous) เป็นคู่ของสปอร์ที่ต่อกันตามยาว ลักษณะของสปอร์เช่นนี้พบได้ในแอคติโนมัยซีทสกุล *Actinobispora* นอกจากนี้ยังพบใน *Actinomadura rugatobispora* และในสกุล *Microbispora* ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นคู่ทรงรี เกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศหรือบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (ศิริรัตน์, 2552)

2.2) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ส่วนมากสายสปอร์จะประกอบด้วยสปอร์จำนวน 7 จนถึง 20 สปอร์ แต่สามารถพบได้น้อยที่สุด 3 สปอร์ และพบได้สูงสุดถึง 30 สปอร์ การสร้างสปอร์ในลักษณะนี้พบได้ใน *Nocardia brevicatena* ซึ่งสร้างสายสปอร์จำนวน 2 จนถึง 7 สปอร์ต่อสายบนส่วนของเส้นใยอาหาร รวมทั้งแอคติโนมัยซีทสกุล *Microtetraspora* และ *Actinomadura* จะสร้างสปอร์สายสั้นๆที่ประกอบด้วยสปอร์จำนวน 4 จนถึง 10-20 สปอร์ต่อสายบนเส้นใยอากาศ โดยสายสปอร์อาจมีลักษณะตรง (straight) เป็นขอ (hooked) เป็นเกลียวซ้อน (spiral) จำนวน 1 ถึง 4 ชั้น หรือเป็นวงเปิด (open loop) และในสกุล *Catellatospora* สายสปอร์จะมีลักษณะตรง จนถึงโค้งงอได้ โดยสายสปอร์อยู่บริเวณปลายก้านชูสปอร์ขนาดสั้นที่อาจแตกหรือไม่แตกแขนง (จามจุรีและคณะ, 2555) การสร้างสปอร์เป็นสายของแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การสร้างสปอร์เป็นสายของแอคตินอมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ

(A) สปอร์คู่ (bisporous) ของ *Microbispora* (B) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ของ *Nocardia brevicatena* (C) สปอร์สายสั้น (oligosporous) ของ *Catellatospora* ที่มา: Li et al., (2016)

2.3) สปอร์สายยาว (polysporous)

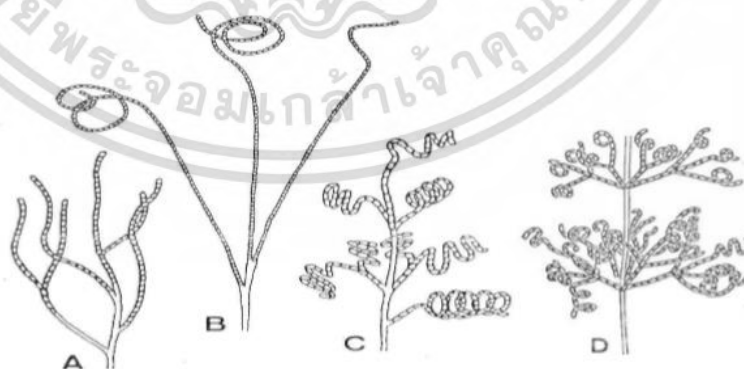
การสร้างสปอร์สายยาว (polysporous) พบได้ในแอคตินอมัยซีทสกุล *Streptomyces* ซึ่งสร้างสปอร์เป็นสายยาวมีจำนวนมากว่า 50 สปอร์ต่อสาย โดยจะเรียกสปอร์ของ *Streptomyces* และ แอคตินอมัยซีทชนิดอื่นที่สร้างสปอร์เป็นจำนวนมากว่า “arthospore” ซึ่งสอดคล้องกับ arthospores ของราในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสายสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย โดยความแตกต่างของลักษณะสาย สปอร์สามารถใช้การจัดจำแนกชนิดได้ ซึ่งการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* ในแต่ละสปีชีส์จะแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

2.3.1) *Rectiflexibiles* สายสปอร์จะมีลักษณะตรง หรือโค้งงอเพียงเล็กน้อย

2.3.2) *Retinaculiaperti* สายสปอร์มีลักษณะคล้ายขอ เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อน 1 จนถึง 3 ชั้น

2.3.3) *Spira* สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ เป็นเกลียวติดกันแน่นทำให้มีลักษณะเหมือนวงปิดและเป็นเกลียวที่ไม่ติดกันแน่นทำให้มีลักษณะเป็นวงเปิด

2.3.4) *Verticillati* สายสปอร์มีลักษณะขดคล้ายกันหอย และแตกแขนง (ศิริรัตน์, 2552)



รูปที่ 2.8 การสร้างสปอร์สายยาว (polysporous) ของ *Streptomyces* ในลักษณะต่างๆ

(A) การสร้างสปอร์แบบ *Rectiflexibiles* (B) การสร้างสปอร์แบบ *Retinaculiaperti* (C) การสร้างสปอร์แบบ *Spira* (D) การสร้างสปอร์แบบ *Verticillati* ที่มา: Li et al., (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์

แอคติโนมัยซีทในหลายสกุลมีการสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ ซึ่งในอับสปอร์นั้นประกอบด้วยสปอร์จำนวนมาก โดยสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร และกลุ่มที่สร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ

3.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ได้แก่ แอคติโนมัยซีทในสกุล *Actinoplans* ซึ่งอับสปอร์มีลักษณะกลม เกือบกลม หรือไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน โดยอับสปอร์อยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม และในสกุล *Pilimelia* อับสปอร์ที่สร้างมีรูปทรงกระบอก ทรงกลม แต่สปอร์มีรูปร่างเป็นแท่ง เรียงตัวกันเป็นแถว หรือเรียงตัวแบบไม่เป็นระเบียบ

3.2) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ ได้แก่ แอคติโนมัยซีทในสกุล *Planomonospora* ซึ่งมีอับสปอร์เป็นรูปทรงกระบอก ภายในอับสปอร์ประกอบด้วยสปอร์เพียง 1 สปอร์ ส่วนในสกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ภายในอับสปอร์ นอกจากนี้ในสกุล *Streptosporangium* จะมีอับสปอร์รูปร่างทรงกลม มีการสร้างผนังกัน เป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ภายในอับสปอร์ (จามจุรีและคณะ, 2555)

2.8 การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ

แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในแหล่งธรรมชาติทั่วไป ทั้งในดิน แหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม โคลน และบริเวณรากพืช ส่วนใหญ่มักพบในดิน ซึ่งในดินสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้มากเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียทั่วไป มักเจริญอยู่บริเวณผิวดิน หรือในดินความลึกไม่เกิน 4 เซนติเมตร ปริมาณของแอคติโนมัยซีทที่พบขึ้นอยู่กับชนิด สภาพ คุณสมบัติทางกายภาพ ปริมาณของอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) โดยปกติในดินจะพบแอคติโนมัยซีทอยู่ในช่วง 10^7 จนถึง 10^8 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม (Ashwathi, 2008) ซึ่งในดินที่มีสภาพเป็นด่างสามารถพบแอคติโนมัยซีทในสัดส่วนที่สูงกว่าดินที่มีสภาพเป็นกรด โดยดินที่มีค่าความเป็นกรดอยู่ในช่วง 6.5 จนถึง 8 จะพบแอคติโนมัยซีทได้สูงถึงร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด ในขณะที่ดินที่มีสภาพเป็นกรดจะพบแอคติโนมัยซีทประมาณร้อยละ 80 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด

แอคติโนมัยซีทที่พบมากที่สุดในดิน คือ สกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความหนาแน่นและมีการกระจายตัวมากที่สุด สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนและยากต่อการย่อยสลาย เช่น ไคติน ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น จึงเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศ ในการหมุนเวียนธาตุอาหาร ก่อให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน (Nair and Padmavathy, 2014) การแยกเชื้อแอคติโนมัยจากตัวอย่างดิน โดยเฉพาะดินนาเกลือ จะต้องแยกจากตัวอย่างดินที่ปล่อยไว้แห้ง จะช่วยในการกำจัดแบคทีเรียทั่วไป และมีการเติมสารปฏิชีวนะ เช่น นีสเตทิน (nystatin) เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยสามารถพบทั้งแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* และกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* (non- *Streptomyces*) หรือกลุ่มแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) เช่น แอคติโนมัยซีทสกุล *Actinoalloteichus* และ *Pseudo-nocardia* ซึ่งแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้สามารถผลิตสารทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ (Jose et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dhanasekaran และคณะ (2004) ทำการแยกแอสคิโนมัยซีทจากตัวอย่างดินนาเกลือ ในเขตอำเภอ ชัคคาลอร์ (Cuddalore) และ Parangipettai ซึ่งอยู่ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย โดยใช้ อาหาร Starch casein agar ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) และเตตราไซคลิน (tetracycline) ความเข้มข้น 50 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและเชื้อ แบคทีเรีย ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างดินมาเจือจางโดยใช้วิธี serial dilution ให้มีความเจือจาง 1:10000000 เกลี่ย ลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน ซึ่งสามารถแยกแอสคิโนมัยซีท ได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลท จากดินนาเกลืออำเภอชัคคาลอร์ (Cuddalore) จำนวน 9 ไอโซเลท และจาก Parangipettai จำนวน 8 ไอโซเลท ในจำนวน 17 ไอโซเลทมี 4 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลทเป็นแอสคิโน มัยซีทสกุล *Streptomyces* และ 1 ไอโซเลทเป็นแอสคิโนมัยซีทสกุล *Saccharomonospora* นอกจากนี้พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio cholera* ได้ดี

Saurav และ Kannabiran (2010) แยกแอสคิโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ในเมืองมารัคกันัม (Marrakanam) และปูดูเชร์รี (Puducherry) ซึ่งเป็นเมืองชายฝั่ง มีเขตแดนติดต่อกับอ่าวเบงกอล ซึ่งสามารถคัด แยกแอสคิโนมัยซีทได้ 164 ไอโซเลท จากดินตัวอย่างทั้งหมด 39 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร International Streptomyces Project-1 (ISP-1), Starch Casein agar (SCA) และ Kuster's agar ได้ 46, 95 และ 23 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยเป็นแอสคิโนมัยซีทในสกุล *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Microbispora* และ ร้อยละ 42, 22, 8, 6, 13 และ 9 ตามลำดับนอกจากนี้ *Streptomyces* VITSVK9 spp. มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) และ *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10273) และสามารถยับยั้งเชื้อรา หรือยีสต์ *Aspergillus niger* (ATCC No 16404), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 46645) และ *Candida albicans* ได้ดี

2.7 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) คือสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การออกฤทธิ์อาจจะก่อให้เกิดผลดีหรือผลเสียเกิดขึ้นได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและปริมาณที่ ได้รับสาร (<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2732/bioactive-ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ>) สารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพต้องมีความจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ที่ผิดปกติ มีฤทธิ์จำเพาะ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ในบางชนิด เป็นต้น (<http://www.vcharkarn.com/varticle/37351>)

แอสคิโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ หลากหลายชนิด เช่น เครื่องสำอาง, วิตามิน, แร่ธาตุ, สารกำจัดวัชพืช, สารปฏิชีวนะ, ยาฆ่าแมลง, สารต้านปรสิต และเอนไซม์ในกลุ่ม Cellulose และ Xylase ซึ่งใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย แอสคิโนมัยซีทเป็นสิ่งมีชีวิต ที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ, ย่อยสลายซากพืชที่เน่าเปื่อย และเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ (Valli et al., 2012). นักวิจัยให้ความสนใจในจุลินทรีย์ในกลุ่มแอสคิโนมัยซีทที่ได้จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสามารถผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ชนิดใหม่ได้ มีการรายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* sp. สามารถผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพและสารจำพวก Secondary metabolite ที่มีประสิทธิภาพหลากหลายชนิด ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ประมาณ 80% มาจาก *Streptomyces* sp. ทั้งสิ้น (Thenmozhi *et al.*, 2011)

สารที่ได้จากธรรมชาติ ยังคงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญสำหรับการผลิตยาชนิดใหม่ๆ แหล่งที่ผลิตสารจากธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยๆ ของสายวิวัฒนาการ (Paul *et al.*, 2005) ยกตัวอย่างเช่น เมื่อนำแบคทีเรียจำนวน 53 ชนิดมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งทางชีวภาพ พบว่ามีแบคทีเรียเพียงแค่ 5 ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารออกมาได้ แบคทีเรียจำนวน 5 ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท ซึ่งสามารถผลิตสารได้มากกว่า 7000 ชนิด (Keller and Zengler, 2004)

แอคติโนมัยซีทเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ, ย่อยสลายซากพืชที่เน่าเปื่อย และเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพ (Valli *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ ที่สามารถสร้างสารในกลุ่ม Secondary metabolite ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพหลากหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และยีสต์ ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทยังสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการปราบศัตรูพืช สารที่เป็นพืชต่อแมลง สารต้านมะเร็ง รวมไปถึงสารปราบวัชพืช และสารที่มีฤทธิ์ในการก่กระบวนภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Waksman and Lechevalire, 1962) จากงานวิจัยของ Shih (Shih *et al.*, 2003) แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีทสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ โดยนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค Damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค Damping off และ Root rot ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ในถั่วและมะเขือเทศด้วยเช่นกัน มีการรายงานจาก Antibiotic Literature Database (ABL) ว่าสารออกฤทธิ์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ 23,000 ชนิด พบว่ามาจากเชื้อรา 42 เปอร์เซ็นต์ มาจาก *Streptomyces* 32.1 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ 10.8 เปอร์เซ็นต์ และแอคติโนมัยซีทที่หายากอีก 15.1 เปอร์เซ็นต์ และหากพิจารณาเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด พบว่าผลิตได้จาก *Streptomyces* 45.6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา 21.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย 16.9 เปอร์เซ็นต์ และแอคติโนมัยซีทที่หายากอีก 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งเป็น *Micromonosporaceae* 38.1 เปอร์เซ็นต์ *Pseudonocardaceae* 15 เปอร์เซ็นต์ *Thermomonosporaceae* 14 เปอร์เซ็นต์ *Nocardia* 11 เปอร์เซ็นต์ *Streptosporangiaceae* 6 เปอร์เซ็นต์ *Nocardioideae* 2.6 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ อีก 13.3 เปอร์เซ็นต์ (Lazzarini *et al.*, 2000) สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* sp. ได้แก่ สารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย เช่น Ampicillin และ Penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบตาแลคแทม (β -lactam) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. clavuligerus* สามารถผลิต Clavam (Muller *et al.*, 1983) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคแทมเมส (β -lactamase) ที่ผลิตโดย *Staphylococci* และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ส่วน Streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และ Neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman *et al.*, 1964) ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ส่วนบุคคลสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Bacilli) และกลม (Cocci) บางชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางประเภท และยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราได้แก่ Nystatin, Polyoxin และ Anthracycline เป็นต้น สำหรับ Anthracycline นอกจากจะเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อราแล้วยังเป็นสารต้านมะเร็งได้อีกด้วย ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอได้ (Goodfellow *et al.*, 1988) สารต่อต้านเชื้อรา และยีสต์ที่พบใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม Polyene (Ball *et al.*, 1988) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Norman *et al.*, 1972) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยีสต์ จะเข้าจับกับ Sterol บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เซลล์จึงไม่สามารถรักษาสภาพไว้ได้ (Hamilton-Miller, 1973) สารต่อต้านเชื้อราที่พบใน *Streptomyces* มีหลายชนิด เช่น Blasticidin S ซึ่งผลิตโดย *S. griseochromogens* (Takeuchi *et al.*, 1958) Kasugamycin ผลิตโดย *S. kasugaensis* (Sato, 1983) และ Polomycin D ผลิตโดย *S. cacaoi* (Isono and Suzuki, 1979) เป็นต้น นักวิจัยให้ความสนใจกลิ่นในกลิ่นในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ได้จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เนื่องจากสามารถผลิตสารในกลุ่ม Secondary metabolite ชนิดใหม่ได้ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ มาจาก *Streptomyces* sp. ทั้งสิ้น (Thenmozhi *et al.*, 2011)



รูปที่ 2.9 สารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยวิธี Agar well diffusion

แหล่งที่มา : (<http://www.biology.mcmaster.ca/fcl/elliott/web/research.html>)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2017)

เลือกเก็บตัวอย่างดินนาเกลือจากตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ในลักษณะแบบสุ่มรูปพื้นปลา เพื่อกระจายการเก็บตัวอย่างดินให้ทั่วถึง โดยกวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นขุดดินลึกลงไปจากหน้าดิน 2-3 เซนติเมตร ใช้ช้อนปลูกตักดินประมาณ 500 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกใส โดยไม่รัดปากถุง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในหลุมทิ้งไว้เวลานาน 30 นาที และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดินด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) โดยเลือกเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุด พร้อมบันทึกตำแหน่งของแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างดินและสภาพตามลักษณะที่เก็บ

3.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท (Jose and Jebakuma, 2013)

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงนาเกลือ (ข้อ 3.6.1) มาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยนำตัวอย่างดินมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มจานเพาะเชื้อ แล้วผึ่งให้แห้งด้วยลมธรรมชาติ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักดิน 1 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงในหลอดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 1 (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) นาน 6 นาที แล้วนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ไปทำการเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-3} โดย 10^{-2} และ 10^{-3} ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) นาน 6 นาที เมื่อทำการเจือจางตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ถึง 10^{-3} มาทำ spread plate technique ลงบนอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่มีการเติม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 4.6 โดยอาหารจะมีการเติมยานิสเตทิน (nystatin) เพื่อต้านการเจริญของเชื้อรา ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ทำอย่างละ 2 ซ้ำ และนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 ถึง 14 วัน ขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลต

3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ (Jose and Jebakuma, 2013)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.2 มาศึกษาระดับความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินนาเกลือโดยนำโคโลนีเดียวที่ได้มาเพาะเลี้ยงบน

อาหาร Starch casein agar (SCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน และตรวจดูการเจริญของเชื้อ

3.4 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน (วสุ, 2554)

3.4.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินความเจือจางตัวอย่างที่ 10^{-1} ที่เหลือจากการเจือจาง ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

3.4.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำเซรามิกหรือบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

3.4.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยช้อนตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆบนผิวน้ำ (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

3.5 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) (Klantbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญเติบโตอยู่บนอาหาร Starch casein agar (SCA) และนำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุดแอสปอร์ตที่บริเวณผิวน้ำของอาหารจนทั่ว แล้วจึงนำสารละลายหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์ที่เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อ เพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก แล้วนำสารละลายที่กรองถ่ายใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 ถึง 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งไปและทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อยเพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ภายในหลอด ทำการ resuspension ด้วย กลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

3.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซี (รัตนภรณ์, 2548)

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสังเกตสีและแรงกวัดของโคโลนีที่เจริญบนผิวน้ำอาหารและใต้ผิวน้ำอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) เส้นใยอากาศ (Aerial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mycerium) และลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture โดยใช้ใบมีดหรือเข็มเย็บเย็บเชื้อตัดชิ้นอาหารแข็ง Yeast extract Malt extract broth (YEME) นำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานแก้ว จากนั้นถ่ายเชื้อโดยใช้ needle ปลายงอเย็บเชื้อ นำไป inoculate ลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน แล้วจึงปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดลงบนก้อนวุ้นเดิม น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่น หลังจากนั้นพันรอบคอของปากจานเพาะเลี้ยงให้รอบแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อให้จานมีความชื้นป้องกันน้ำระเหย แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ (1 – 2 อาทิตย์) แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกำลังขยายต่ำสุด 40 เท่า

3.7 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท (Buchanan *et al.*, 2558)

3.7.1 การตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ในนํ้านม (Skim milk) (Reynolds, 2011)

ถ่ายเชื้อแอกติโนมัยซีท 1 หลอดลงในอาหาร Skim milk ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการตรวจผลการตกตะกอนในหลอดทดลอง (Coagulation)

ฉีดเชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นเส้นตรงยาวตามแนวนอนจากขอบด้านหนึ่งถึงขอบอีกด้านลงบนอาหาร Skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในนํ้านมเกิดขึ้นโดยวัดจากความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) โดยเลือกเฉพาะไอโซเลทที่เกิดบริเวณใสมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป (Casein hydrolysis)

3.7.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)

ลงเชื้อแอกติโนมัยซีท 1 หลอดเต็มในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

3.7.3 การย่อยไนเตรท (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทใน Peptone KNO₃ broth ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกลงไป 2 หยดและสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง

3.7.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาฉีดลงบนอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยการเทราดด้วยสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลนของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบและอัตราการเจริญ

โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาจากข้อ 3.7.4 ในอาหารเหลว Inorganic salts-starch agar (ISP4) เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมคือ International *Streptomyces* Project (ISP2) ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีท ตามขั้นตอนต่างๆดังนี้

3.8.1 Spore pre-germination และการ Inoculation (Klanbut, 2013)

ทำการดูด Spore suspension 500 μ L ลงในอาหาร 25 mL International *Streptomyces* Project (ISP2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ 450 nm.

คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์เพื่อทราบปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เท่ากันคือ 3×10^6 Pre-germinated spores (gs) ในการ inoculate ลงในอาหารเหลวต่อไป โดยคำนวณจากสูตร

$$C = (OD_{450} / 0.04) \times (4 \times 10^6) \text{ gs mL}^{-1}$$

$$= OD_{450} \times 10^8 \text{ gs mL}^{-1}$$

$$V = (3 \times 10^6 / C) \times 1000 \mu\text{L}$$

3.8.2 ลงเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลวที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบคืออาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) ที่ปรับความเข้มข้นของ Soluble Starch ที่ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมคือ International *Streptomyces* Project (ISP2) เก็บ cell dry weight ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง คัดเลือกไอโซเลตที่เจริญดีที่สุดเพื่อทำการทดลองต่อไป

3.8.3 การเจริญที่ระดับความเป็นกรดต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP2) ที่ปรับพีเอชเป็น 7, 8, 9 และ 10 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญที่ระดับพีเอชต่างๆ เก็บ cell dry weight ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.8.4 การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP2) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บ cell dry weight ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.8.5 การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project (ISP2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆเก็บ cell dry weight ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห่าน้ำหนักเซลล์แห้งโดยกรองเซลล์แอกติโนมัยซีท 5 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (over night) และชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์แอกติโนมัยซีทไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักรวม และห่าน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) จากสูตร

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{T_2 - T_1}$$

$$\text{Doubling time } (t_d) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$= \frac{0.693}{\mu}$$

โดยที่ X_1 = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นของช่วง log phase

X_2 = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงสุดท้ายของช่วง log phase

T_1 = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นของช่วง log phase

T_2 = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงสุดท้ายของช่วง log phase

3.9 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase

การสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ใช้วิธีดัดแปลงจากการทดสอบในจานอาหารแบบรวดเร็ว (rapid plate assay) ด้วยอาหาร Modified M-9 ผสม phenol red 0.009 เปอร์เซนต์ (Gulati *et al.*, 1997) โดยเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็งและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบรอบโคโลนีของไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ L-asparaginase จากสีส้มเป็นสีชมพู

3.10. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

3.10.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ใช้หว่านถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TIRTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ลงบนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

3.10.2 การเตรียมเชื้อแอกติโนมัยซีทเพื่อทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ใช้หว่านถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อแอกติโนมัยซีทที่บริสุทธิ์แล้วลากเป็นเส้นตรงบนอาหาร glucose yeast extract agar บ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.10.3 การทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ใช้หว่านถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ แล้วลากให้ตั้งฉากกับเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหาร glucose yeast extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตระยะห่างระหว่างแนวการเจริญของ แอคติโนมัยซีทกับเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น แล้วบันทึกผลการทดลองโดยวัดระยะห่างที่เกิดขึ้น

3.11 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ (จิตติ, 2550)

3.11.1 ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Yeast extract Malt extract (YEME) บ่มเชื้อที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YEME ที่เติม 0.1% CaCO_3 โดยเติม inoculum ลงไป 1% บ่มเชื้อที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.11.2 นำน้ำหมักเชื่อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ Ethyl acetate จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน (Vacuum evaporator) จะได้สารสกัดหยาบในส่วน Ethyl acetate (crude EtOAc extract) เก็บในขวด vial ที่ปราศจากเชื้อ และนำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี agar disc diffusion (Lorain, 1980)

3.11.3 นำส่วนเซลล์ใสในขวดรูปชมพู่ที่ปราศจากเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจากนั้นเติมน้ำที่เติม Methanol ลงไป 50-100 มิลลิลิตรขึ้นกับปริมาณเซลล์ บ่มเชื้อที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน นำน้ำหมักเชื่อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ Methanol จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน (Vacuum evaporator) จะได้สารสกัดหยาบในส่วน Methanol (crude methanol extract) เก็บในขวด vial ที่ปราศจากเชื้อ และนำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี agar disc diffusion

3.11.4 เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Muller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 10.1 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

3.11.5 จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อ disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

3.12 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) (Nakajima *et al.*, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA จะถูกสกัดโดยใช้วิธี Colony PCR ยีน 16S rRNA ถูก amplify โดยใช้ไพรเมอร์ คือ 9f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') และ 1541r (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3') ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) (Yukphan และคณะ, 2005) โดยเริ่มจากใช้อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาอีก 30 รอบ (denaturation) ด้วยอุณหภูมิ 94 °C 1 นาที , primer annealing (55 °C 1-5 นาที), primer extension (32 °C 2-5 นาที) ในช่วงท้ายของกระบวนการจะเก็บที่ 72 °C 10 นาที และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ชิ้นส่วน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนจะถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี PCR product purification (HiGene™ Gel & PCR Purification System) และเพิ่มปริมาณโดย Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST program และ Alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตรงกันด้วยสายพันธุ์ต้นแบบจาก EzBioCloud เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BioEdit Sequence Alignment Editor จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง Phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ข้อมูลที่คล้ายกันมากที่สุดจะถูกจับคู่และบันทึกความเป็นไปได้ในการจัดจำแนกแผนภูมิต้นไม้ถูกสร้างโดยใช้ neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), มีขั้นตอนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ใน Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7) software package version 6.06 (Tamura K *et al.*, 2004) ระยะวิวัฒนาการของ neighbour-joining และ maximum-likelihood trees อ้างอิงตาม Kimura's two-parameter method (Kimura M., 1980)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี จะแบ่งออกเป็น 2 ครั้งซึ่งเก็บในฤดูกาลทำนาเกลือที่แตกต่างกัน คือ ครั้งที่ 1 (ดิน A) เก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม และธันวาคม 2559 และเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 (ดิน B) เก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม และ มีนาคม 2560 โดยทำการเก็บตัวอย่างดินครั้งละ 10 ตำแหน่ง นำมาหาคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน (ดังวิธีการที่ 3.4) พบว่า ปริมาณของน้ำหนักดิน, ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 และนำตัวอย่างดินทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจนได้เชื้อบริสุทธิ์ (ดังวิธีการที่ 3.1 และ 3.2) และกำหนดหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่บริสุทธิ์ต่อไป โดยกำหนดหมายเลขไอโซเลท ดังนี้ หมายเลขตัวแรก คือ ลำดับของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้, หมายเลขที่สอง คือ จุดที่เก็บจากตัวอย่างดิน และหมายเลขที่สาม คือ ระดับความเจือจางที่สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน A

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	7.709	12.78	7.45
จุดที่ 2	7.186	12.63	7.49
จุดที่ 3	7.602	8.44	7.57
จุดที่ 4	7.717	8.42	7.80
จุดที่ 5	7.484	10.52	7.91
จุดที่ 6	7.617	9.33	7.54
จุดที่ 7	6.597	7.44	7.91
จุดที่ 8	7.637	14.14	7.64
จุดที่ 9	7.647	9.44	7.78
จุดที่ 10	7.829	11.56	7.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ผู้ใช้ไปใช้ประโยชน์ด้านการทำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน B

ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความ เป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	7.627	46.75	8.29
จุดที่ 2	7.159	49.31	8.37
จุดที่ 3	7.630	43.72	8.31
จุดที่ 4	7.772	39.85	8.24
จุดที่ 5	7.489	40.36	8.21
จุดที่ 6	7.723	46.68	8.41
จุดที่ 7	6.820	44.07	8.28
จุดที่ 8	7.490	44.55	8.18
จุดที่ 9	7.419	49.79	8.36
จุดที่ 10	8.067	39.73	8.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

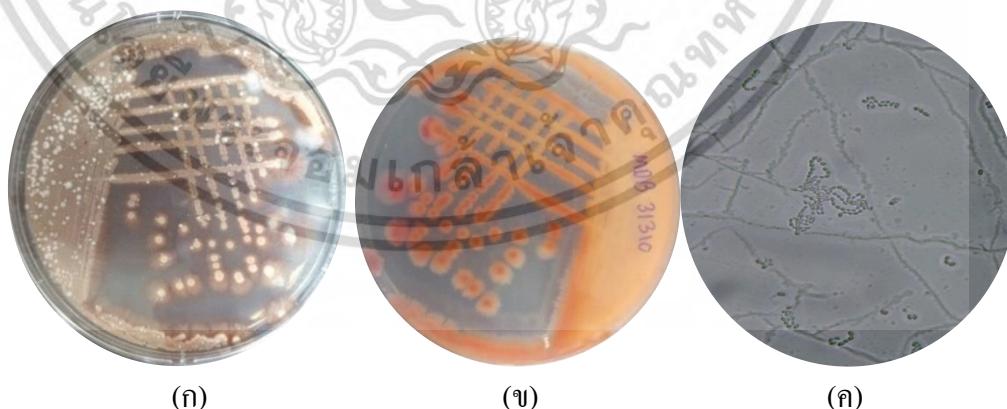
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท์

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี จะแบ่งออกเป็น 2 ครั้ง ซึ่งเก็บในฤดูกาลทำนาเกลือที่แตกต่างกัน คือ ครั้งที่ 1 (ดิน A) เก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม และธันวาคม 2559 และเก็บตัวอย่างดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ครั้งที่ 2 (ดิน B) เก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม และ มีนาคม 2560 ได้นำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 1 และนำระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} มาทำ spread plate ลงบนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ที่มีการเติม 4.6% หรือ 4.6 g/L NaCl (Jose and Jebakuma, 2013) และ Nystatin ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน พบว่า จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้มีจำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท์โดยสังเกตสีและรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหาร และได้พิจารณาอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/IBCC Color System และสังเกตลักษณะเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) เส้นใยอากาศ (Aerial mycerium) และลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีท์ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Pink มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วย

1.1 เชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB31310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Strong Yellowish Pink เส้นใยอาหารสี Vivid Reddish Orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลทที่ MDB31310

(ก) แสดงลักษณะ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลทที่ MDB31310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลทที่ MDB31310 ได้ผิวหน้าอาหาร

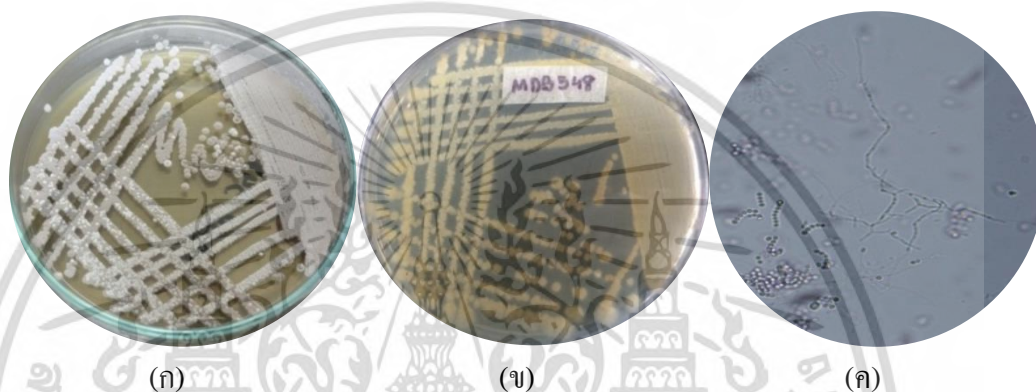
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลทที่ MDB31310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแอสเพอร์จิลลินัมที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลทประกอบด้วย

2.1 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท MDB548 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์เล็กน้อย (Oligosporous) ลักษณะเหมือนกับ *Catellatospora*



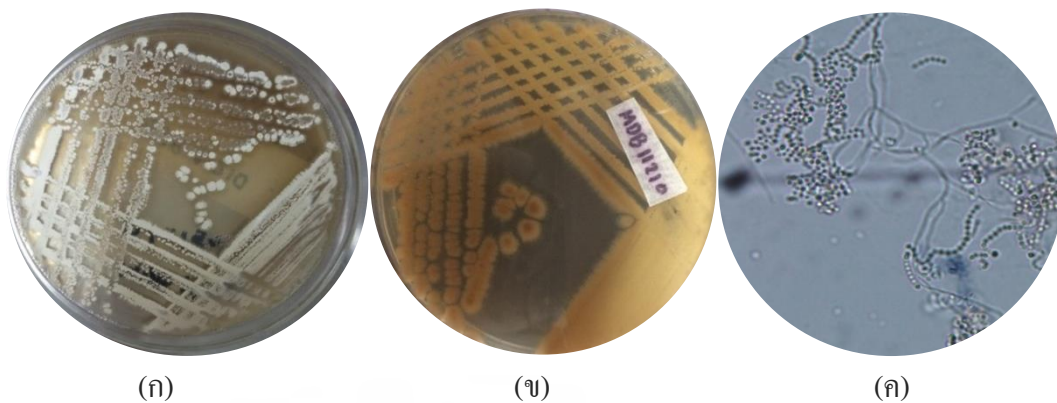
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลทที่ MDB548

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลทที่ MDB548 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลทที่ MDB548 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลทที่ MDB548 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.2 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท MDB11210 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB11210

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB11210 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB11210 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB11210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลต MDB3422 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB3422

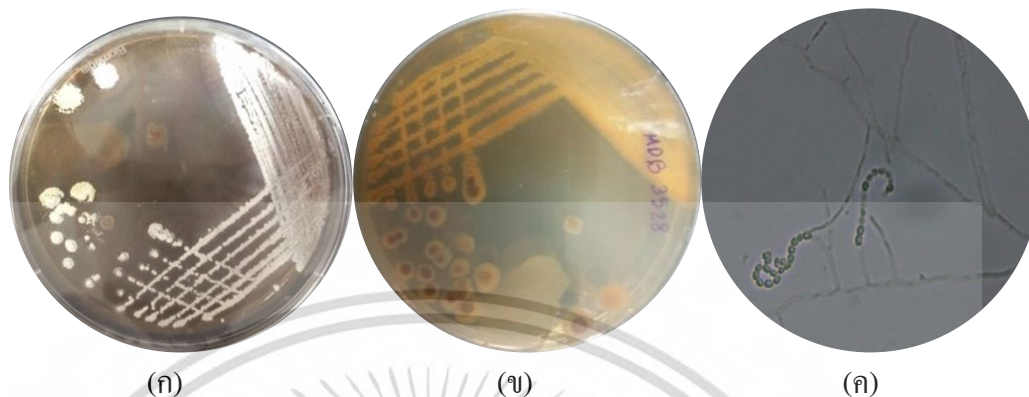
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB3422 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB3422 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pasteurii* ไอโซเลตที่ MDB3422 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB3528 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Grayish Yellow และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



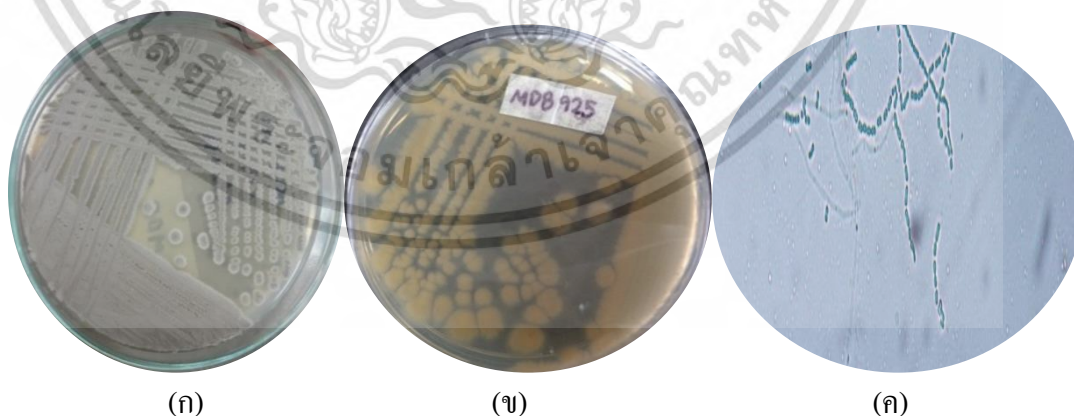
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3528

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3528 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3528 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB3528 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.5 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยอาหารสี Grayish Reddish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

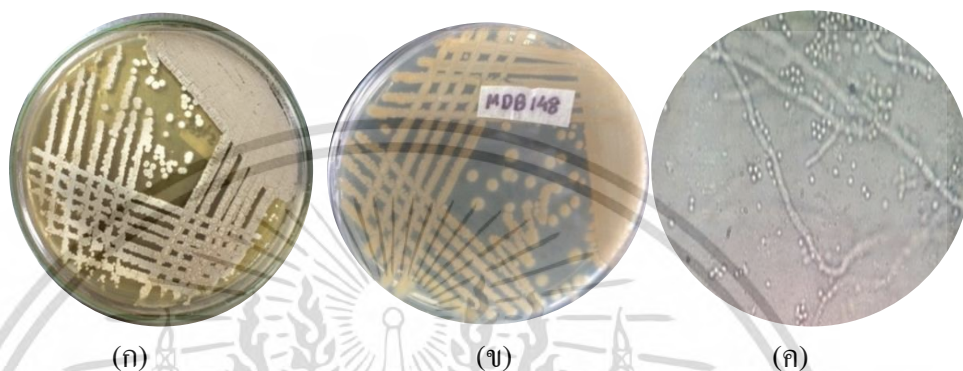
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ได้ผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.6 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB148 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Brown เส้นใยอาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous) และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148

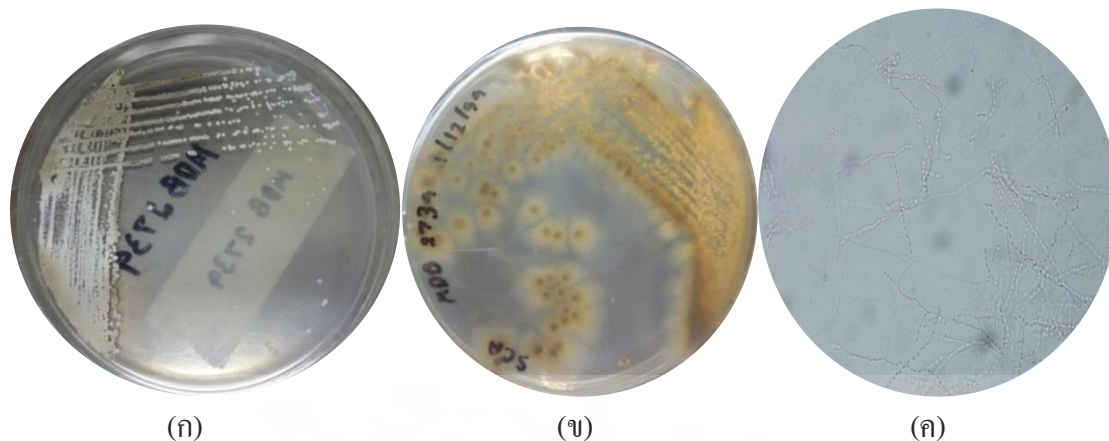
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB148 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย

3.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2739 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Green เส้นใยอาหารสี Grayish Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibles



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2739

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2739 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2739 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2739 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

3.2 เชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2839 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Greenish Gray เส้นใยอาหารสี Grayish Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2839

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2839 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

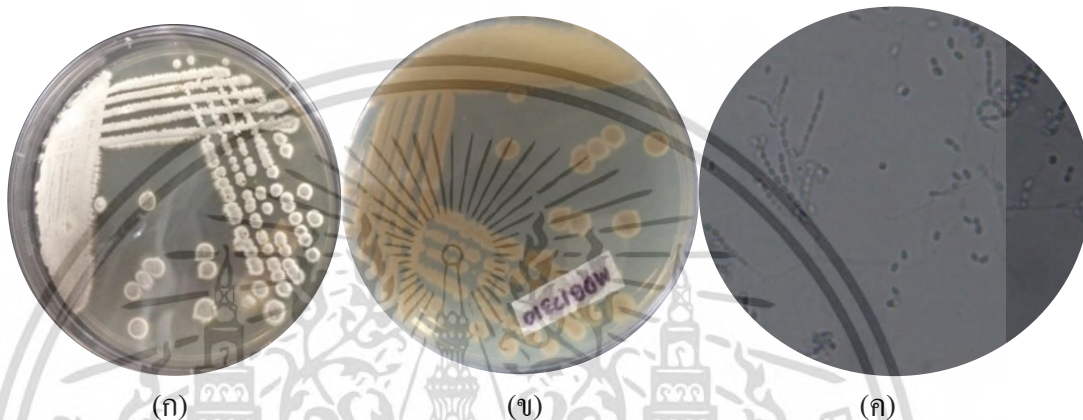
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไลสMDB2839 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลตที่ MDB2839 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มแอสเพอร์จิลลินัมที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีสมาชิกทั้งหมด 31 ไอโซเลตประกอบด้วย

4.1 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลต MDB17310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Light Olive ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



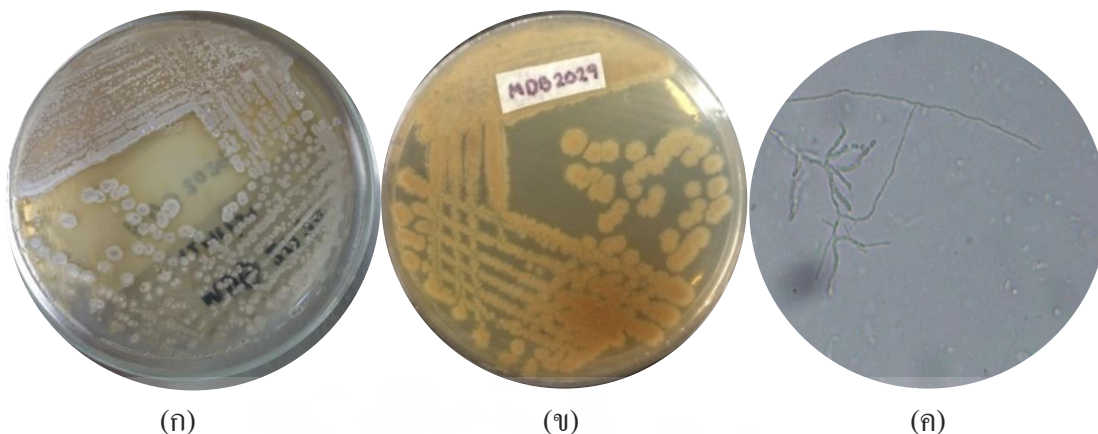
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลตที่ MDB17310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลตที่ MDB17310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลตที่ MDB17310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลตที่ MDB17310 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

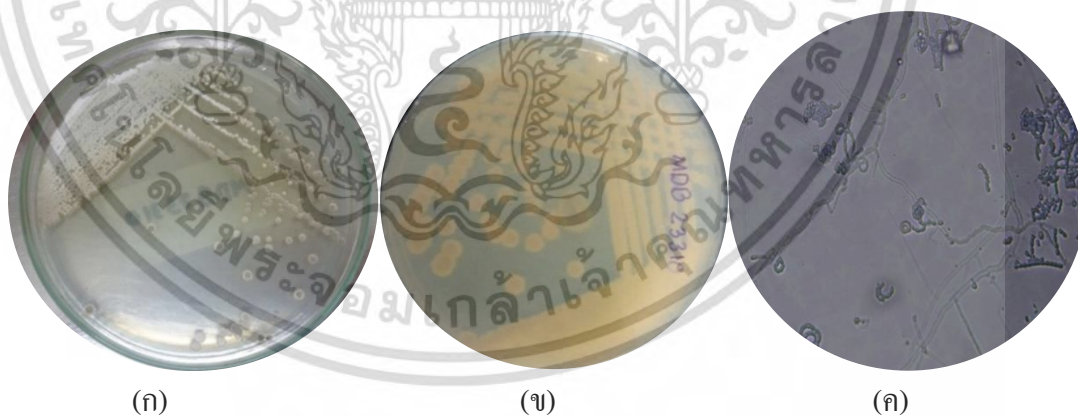
4.2 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลต MDB2029 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Light Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Dark Orange Yellow และสร้างสปอร์แบบ สายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB2029)

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB2029) บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB2029) ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB2029) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.3 เชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB23310) มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



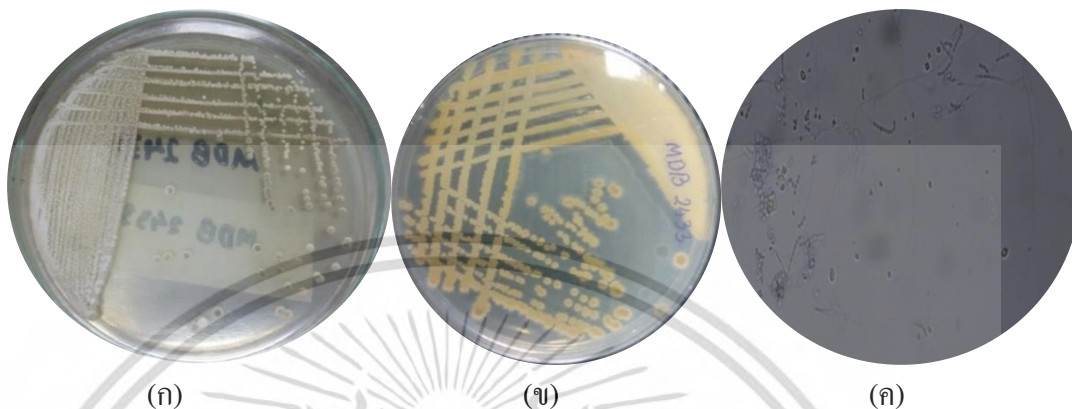
รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB23310)

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB23310) บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB23310) ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus thuringiensis (MDB23310) ภายใต้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

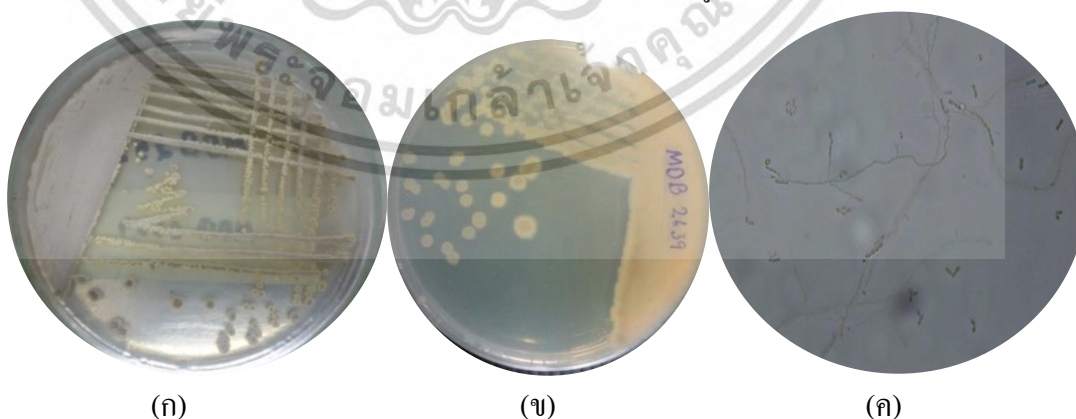
4.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2433 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2433 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.5 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2639 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Light Blue เส้นใยอาหารสี Deep Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ Light Yellowish Brown สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์แบบคู่ (bisporous หรือ disporous)



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639

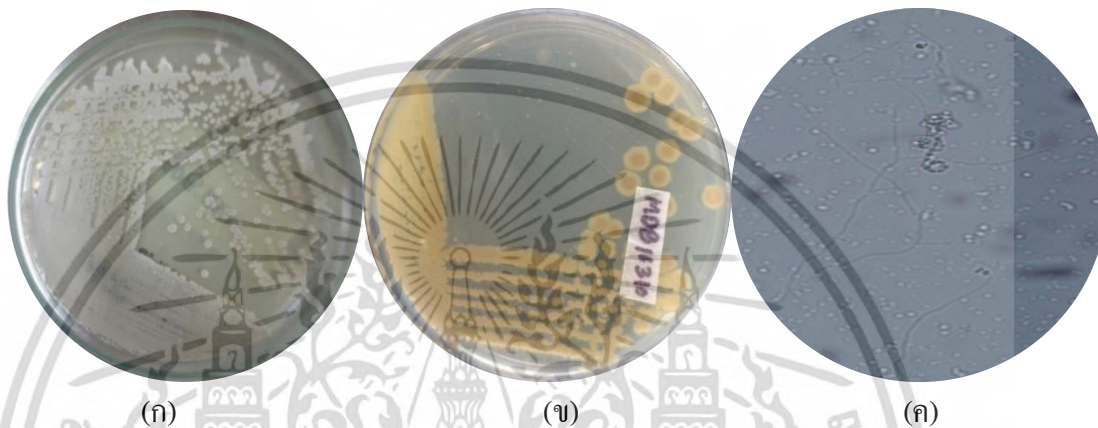
- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 ได้ผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2639 ภายใกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.6 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB16310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



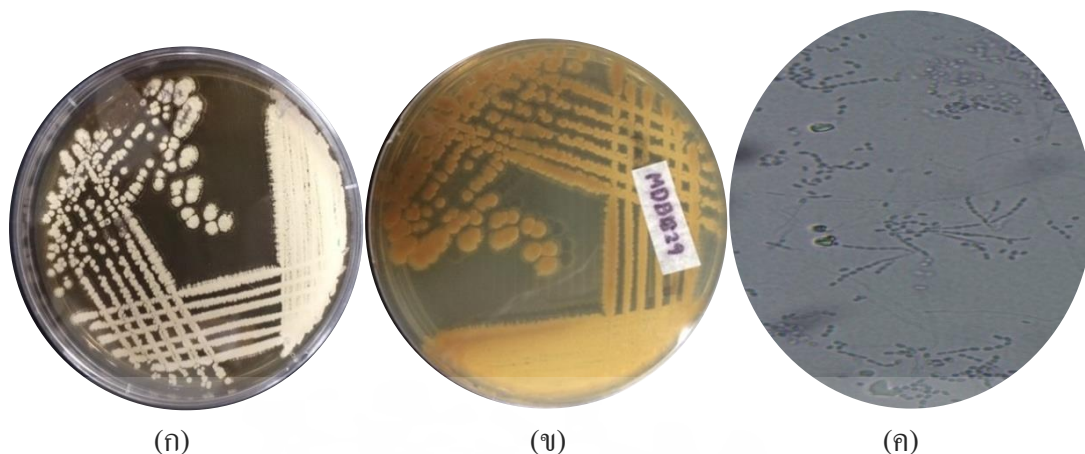
รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 บนผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 ได้ผิวน้ำอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB16310 ภายใกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.7 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1829 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Grayish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Moderate Greenish Yelllow และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



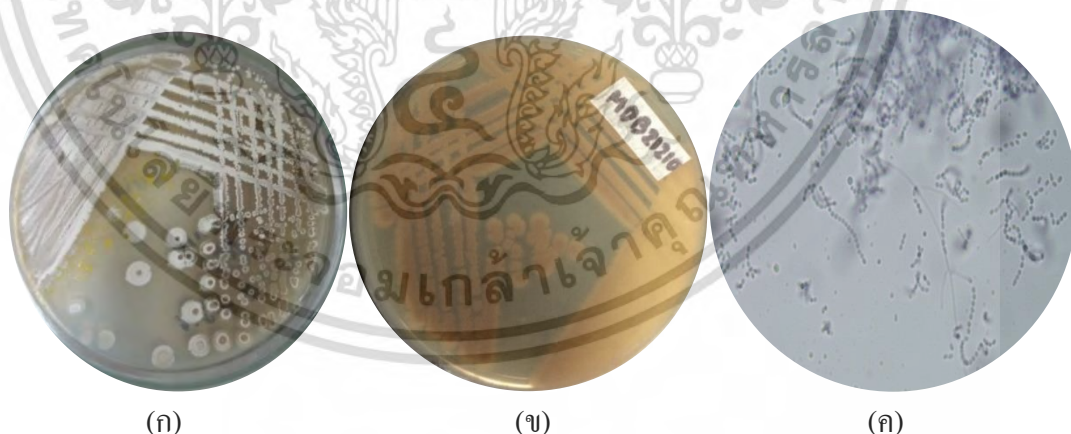
รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB1829

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB1829 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB1829 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB1829 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.8 เชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB21210 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Light Grayish Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ Strong Greenish Yellow และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB21210

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB21210 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

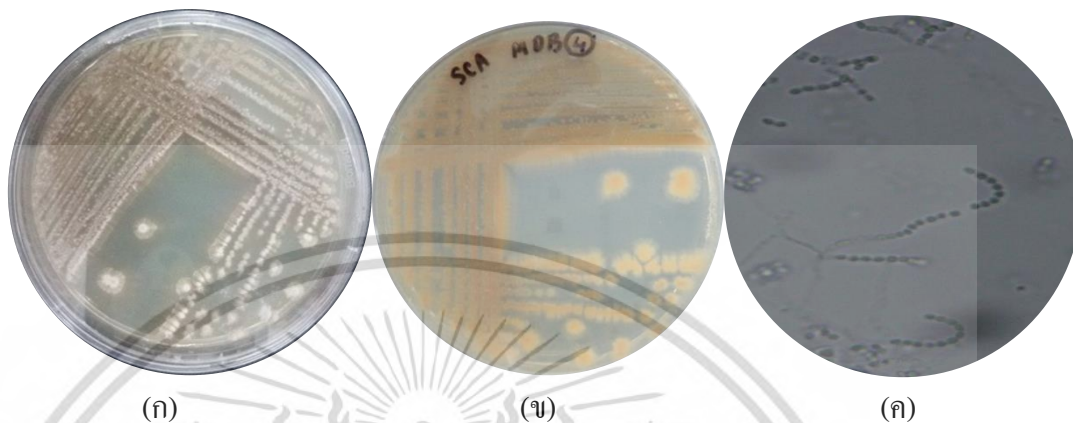
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB21210 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไอสไลต์ MDB21210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารทงวนไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.9 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB432 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Light Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



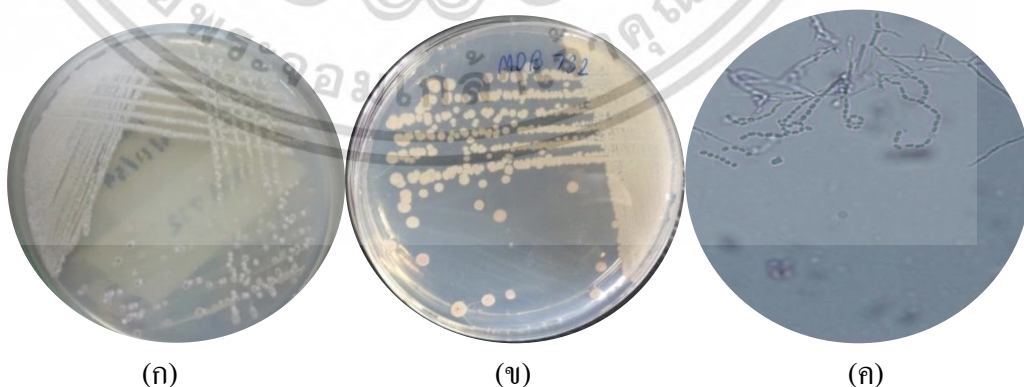
รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB432

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB432 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB432 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB432 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.10 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB732 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB732

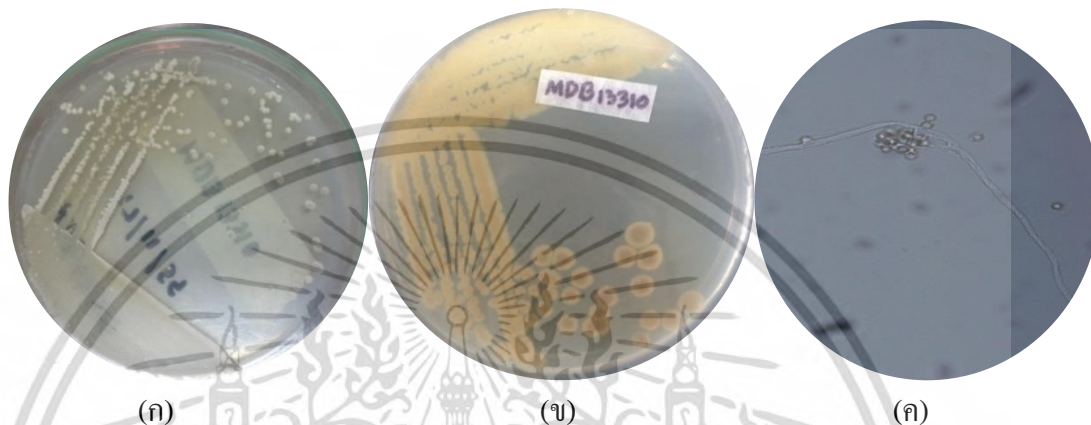
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB732 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB732 ได้ผิวหนังอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB732 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.11 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB13310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous)



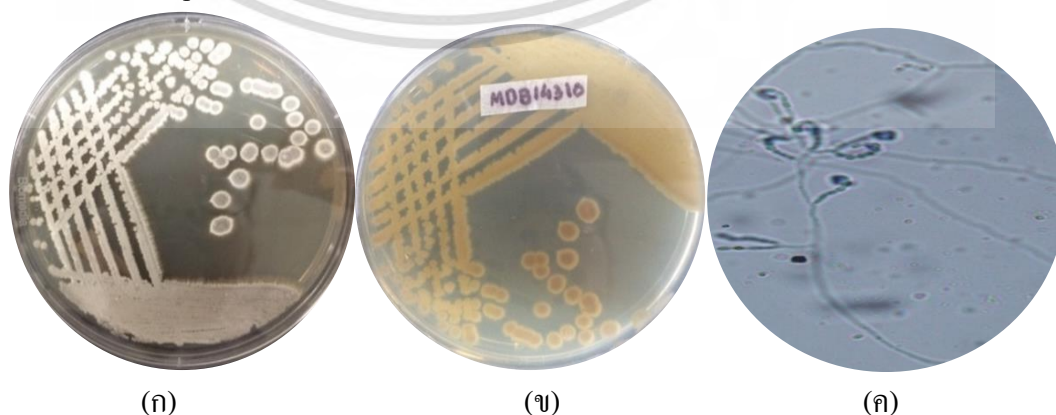
รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 บนผิวหนังอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 ได้ผิวหนังอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB13310 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.12 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB14310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310

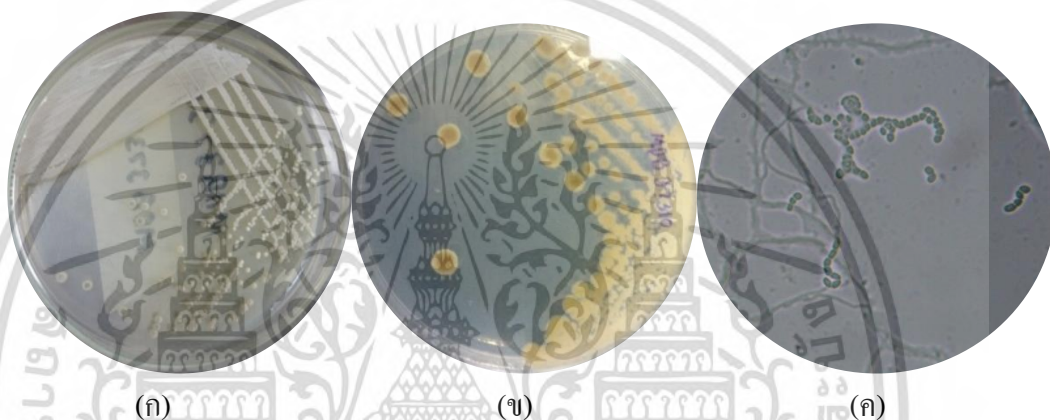
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้ผู้อื่นใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB14310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.13 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB37310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



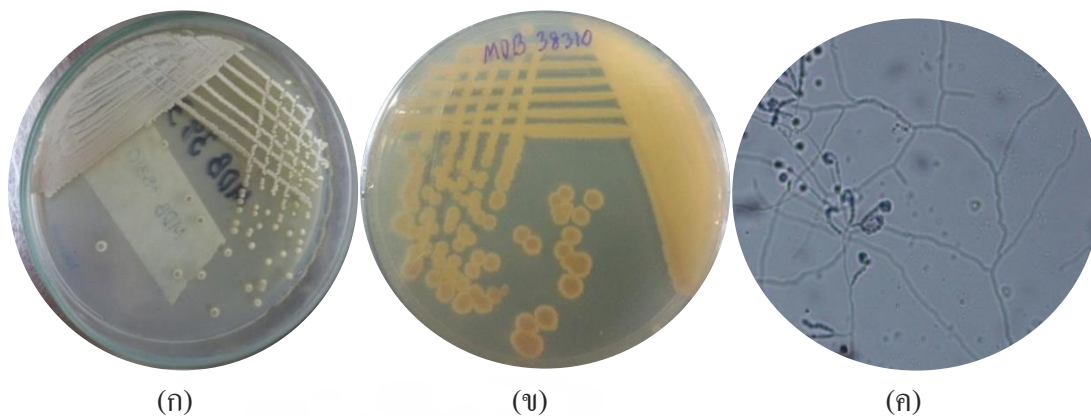
รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB37310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB37310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB37310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB37310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.14 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB38310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



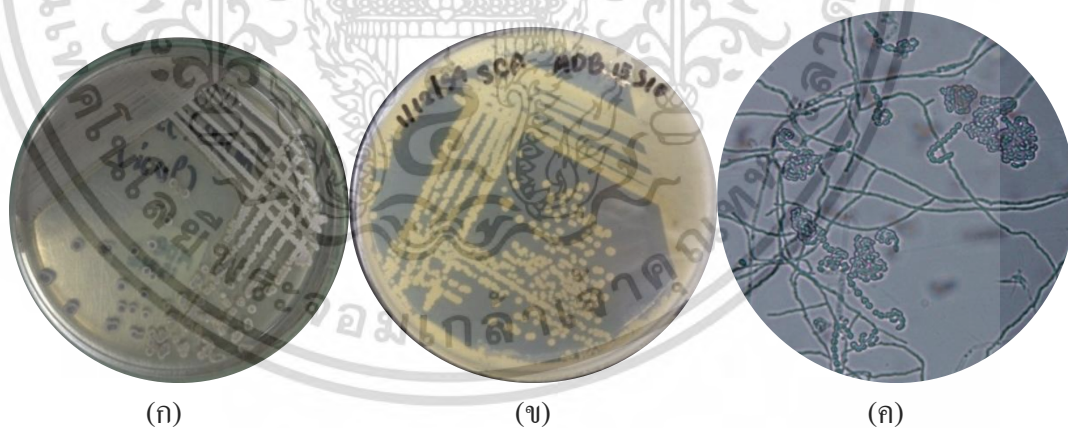
รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB38310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB38310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB38310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB38310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.15 เชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลท MDB15310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB15310

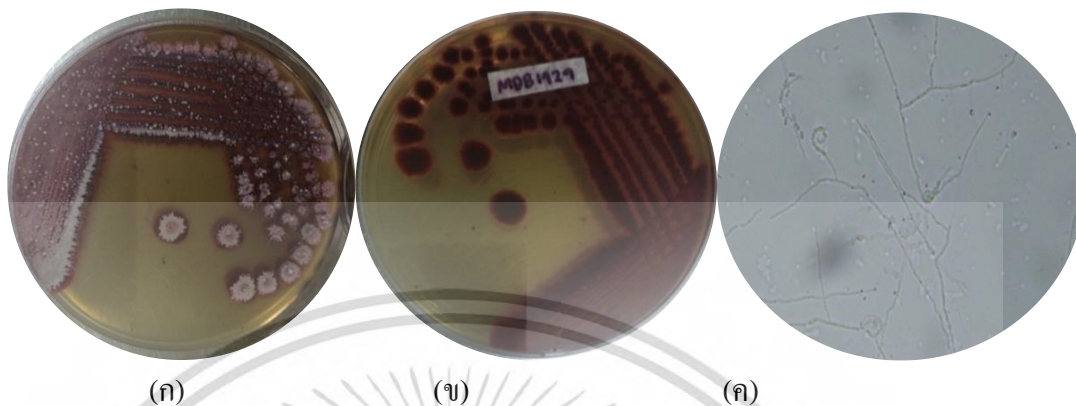
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB15310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB15310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันสไคโซเลทที่ MDB15310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบให้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1929 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Vivid Purplish Red สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ Strong Greenish Yellow สร้างสปอร์แบบ สายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti และ สร้างสปอร์แบบคู่ (bisporous)



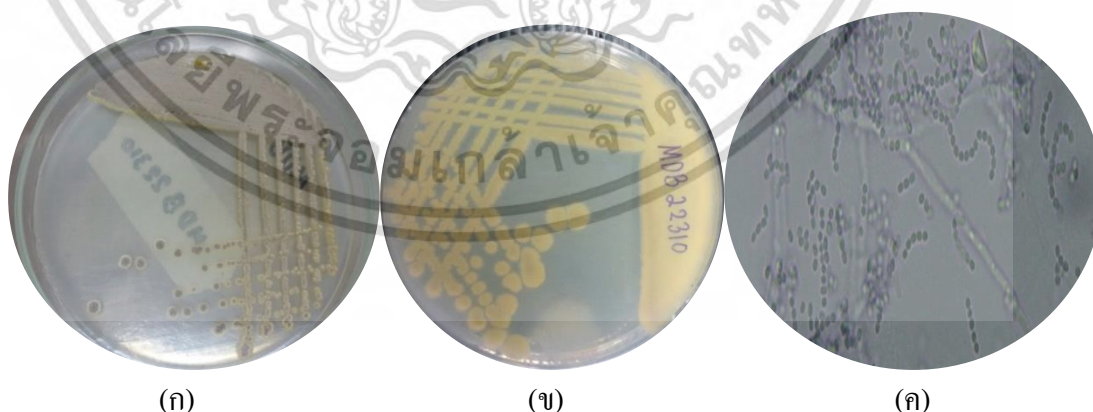
รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.17 เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท MDB22310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous) และ สร้างสปอร์บน สายใยอากาศ ลักษณะเหมือน *Nocardia*



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB22310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB22310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

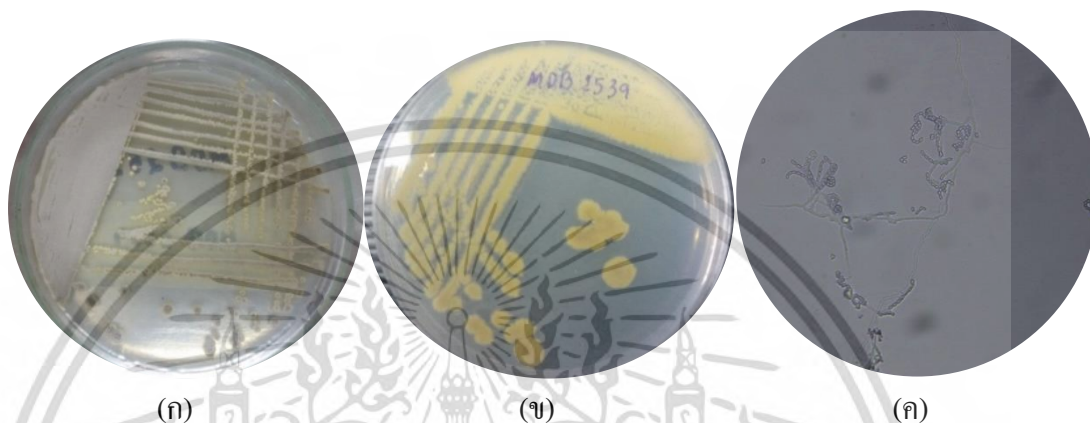
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB22310 ใต้ผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB22310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.18 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2539 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



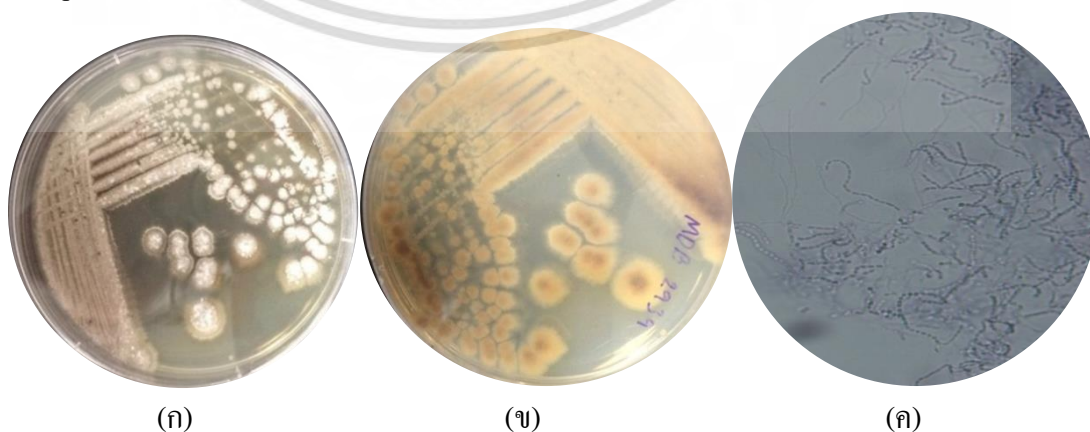
รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2539

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2539 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2539 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB2539 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.19 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB2939 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Greenish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti

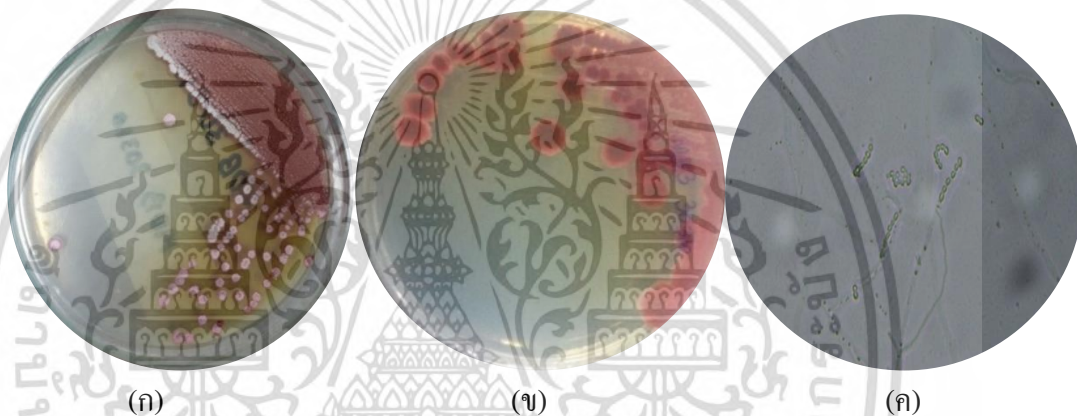


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2939

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2939 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2939 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB2939 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

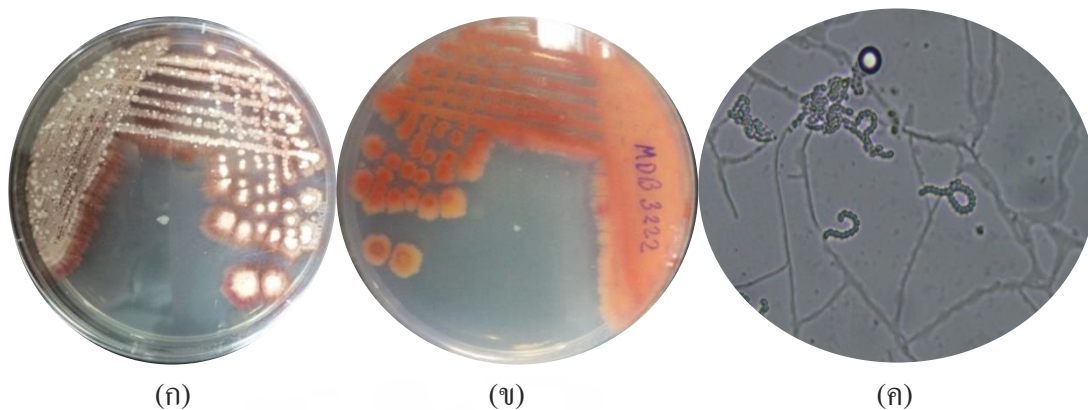
4.20 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB30310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Purplish Red สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ Light Brown และสร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB30310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB30310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB30310 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลตที่ MDB30310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.21 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต MDB3222 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



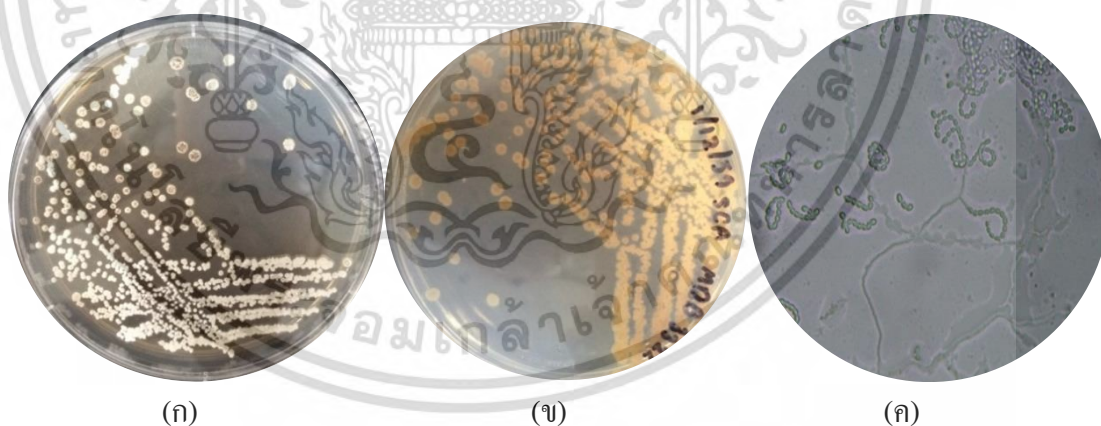
รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3222

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3222 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3222 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.22 เชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลท MDB3322 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Dark Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายขาว(Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3322

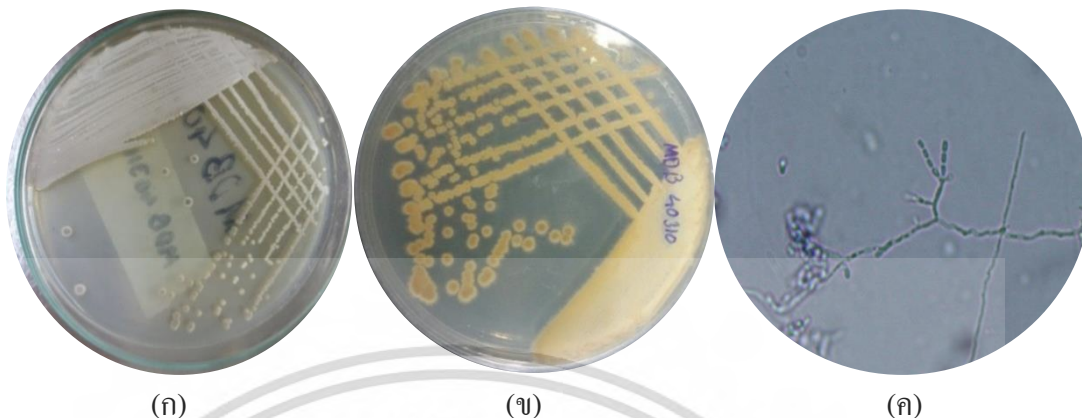
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3322 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3322 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไมซีทีไอโซเลทที่ MDB3322 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.23 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ MDB40310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Blue เส้นใยอาหารสี Strong Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



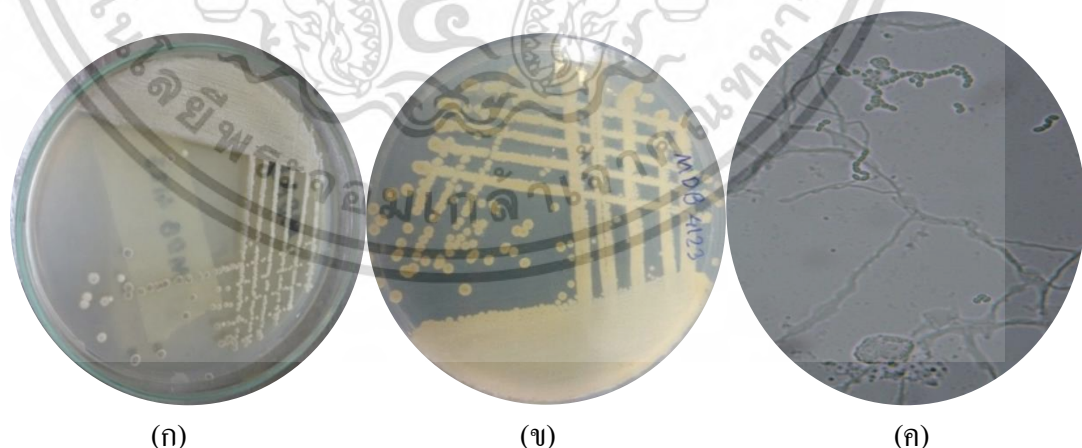
รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB40310

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB40310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB40310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB40310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.24 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ MDB4123 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Strong Greenish Yellow และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati



รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB4123

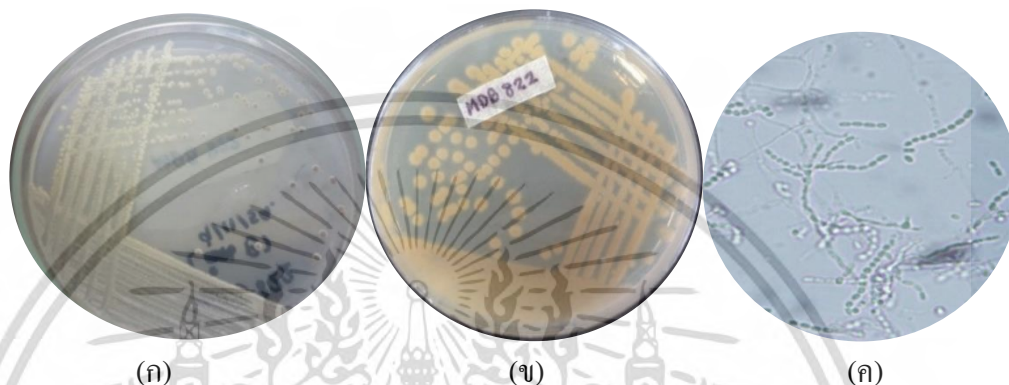
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB4123 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสไลต์ที่ MDB4123 ใต้ผิวหน้าอาหาร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB4123 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.25 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB822 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexibiles



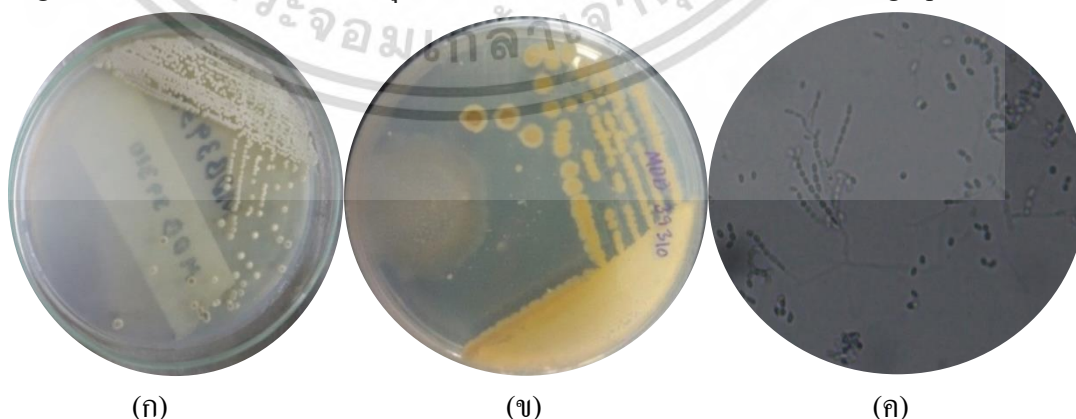
รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB822 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.26 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท MDB39310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์เล็กน้อย (oligosporous)



รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310

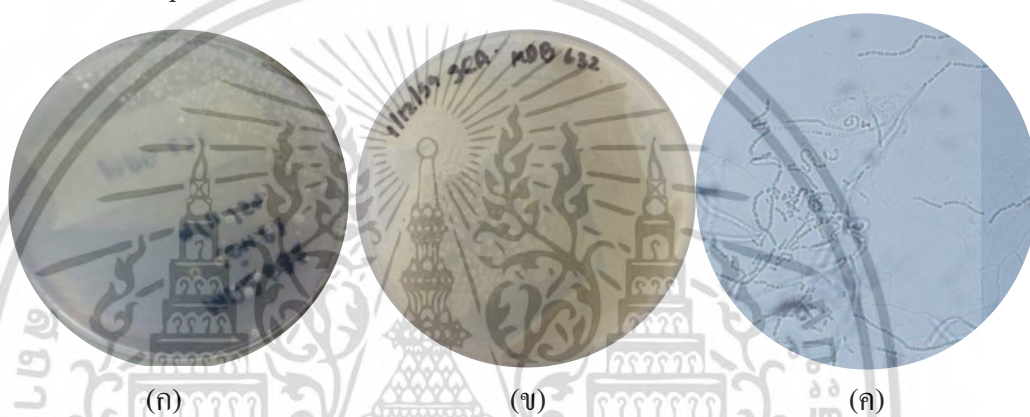
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB39310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.27 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB632 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Strong Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti



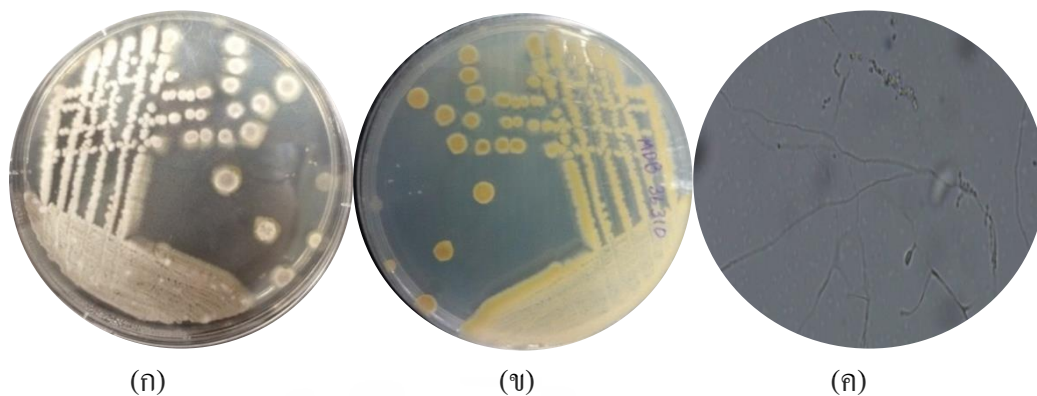
รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB632 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

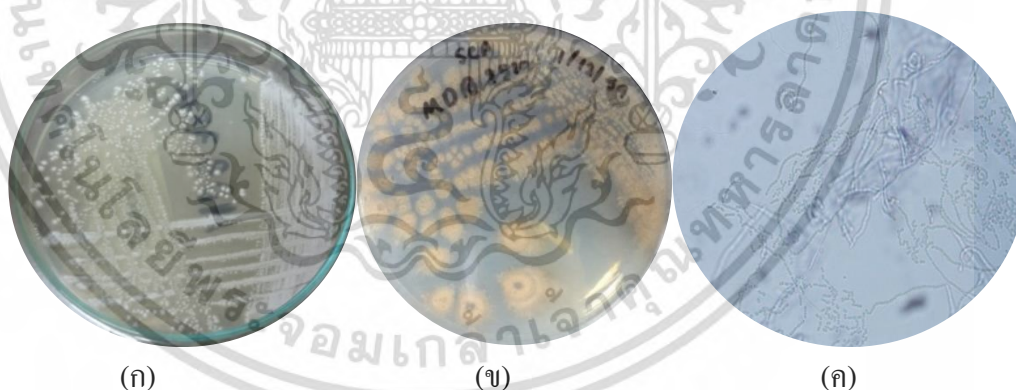
4.28 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB36310 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Grayish Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบเดี่ยว (monosporous)



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB36310

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB36310 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB36310 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB36310 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.29 เชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลต MDB2510 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Graying Blue เส้นใยอาหารสี Bluish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้และสร้างสปอร์แบบสายขาว (Polysporous) มีลักษณะเป็นแบบ Retinaculiaperti

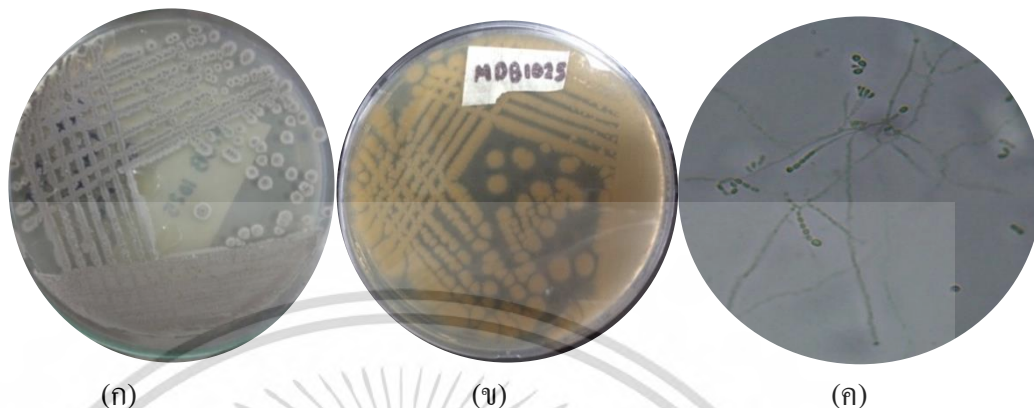


รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB2510

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB2510 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB2510 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลไนดูลันซ์ไอโซเลตที่ MDB2510 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

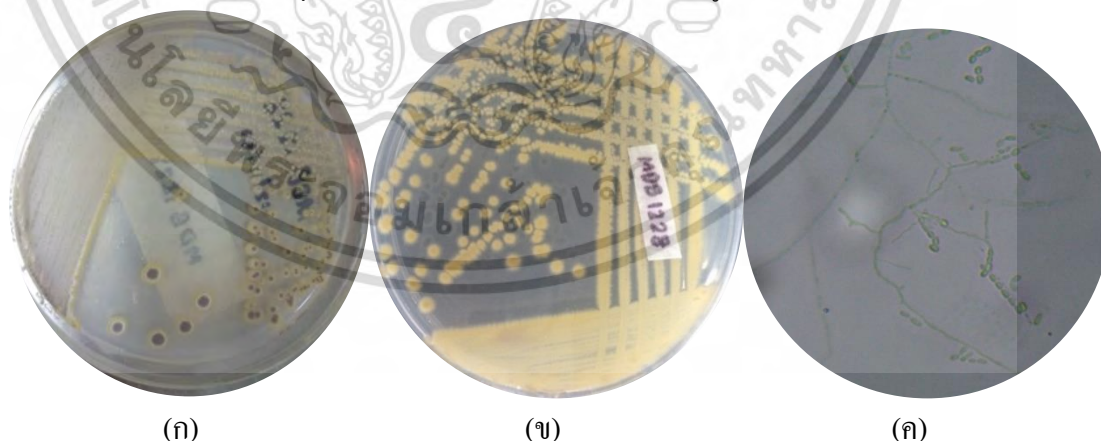
4.30 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1025 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Bluish Gray เส้นใยอาหาร สี Deep Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์แบบสาขยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ *Retinaculiaperti* และสร้างสปอร์เป็นสายแบบ Oligosporous ของ *Catellatospora*



รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1025

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1025 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1025 ใต้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1025 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.31 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1228 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Bluish Gray เส้นใยอาหารสี Light Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และสร้างสปอร์แบบคู่ (oligosporous)



รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 ใต้ผิวหน้าอาหาร

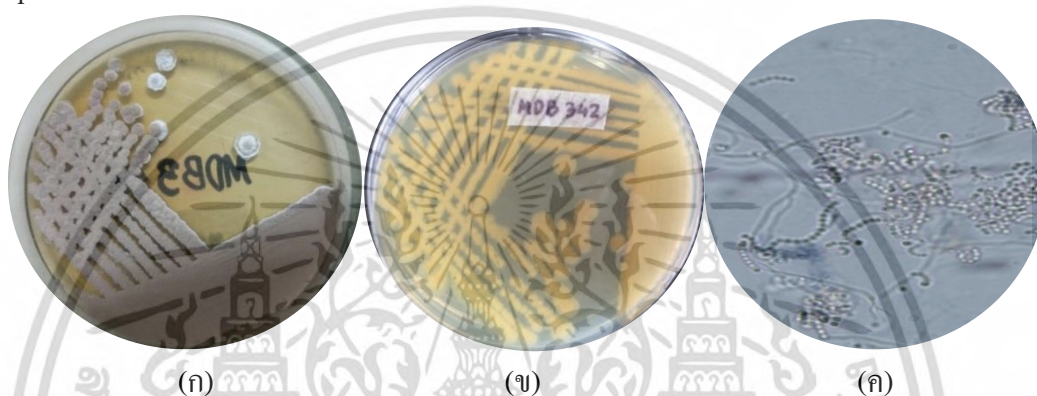
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB1228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วย

5.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB342 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Purplish Gray เส้นใยอาหารสี Brilliant Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และ สร้างสปอร์แบบสายยาว(Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira



รูปที่ 4.41 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 บนผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 ได้ผิวหน้าอาหาร Strach Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB342 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี

The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้า อาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
1	MDB31310	+	#FF7A5C Strong Yellowish Pink	#F13A13 Vivid Reddish Orange	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
2	MDB548	+	#FFE2B7 Yellowish White	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB11210	+	#FFE2B7 Yellowish White	#B07D2B Dark Yellow	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB3422	+	#FFE2B7 Yellowish White	#5E3830 Grayish Reddish Brown	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB3528	+	#FFE2B7 Yellowish White	#5E3830 Grayish Reddish Brown	#A47C45 Dark Grayish Yellow
	MDB925	+	#404234 Olive Gray	#9B8127 Dark Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้
	MDB148	+	#945DDB Light Olive Brown	#DCD36A Light Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี

The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้า อาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
3	MDB2739	+	#8D917A Pale Green	#575E4E Grayish Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2839	+	#7A7666 Greenish Gray	#8C4743 Grayish Red	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
4	MDB17310	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#846A20 Light Olive	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2029	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#BB8B54 Light Yellowish Brown	#C37629 Dark Orange Yellow
	MDB23310	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#D79D41 Moderate Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2433	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#D79D41 Moderate Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2639	+	#A6BDD7 Very Light Blue	#B57900 Deep Yellow	#BB8B54 Light Yellowish Brown
	MDB16310	+	#C1CACA Very Pale Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB1829	+	#C1CACA Very Pale Blue	#CEA262 Grayish Yellow	#C4A43D Moderate Greenish Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี

The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบนผิวหน้า อาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB21210	+	#C1CACA Very Pale Blue	#B48764 Light Grayish Yellowish Brown	#CCA817 Strong Greenish Yellow
	MDB432	+	#919192 Pale Blue	#C2A894 Light Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB732	+	#919192 Pale Blue	#FFE2B7 Yellowish White	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB13310	+	#919192 Pale Blue	#9B8127 Dark Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB14310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB37310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB38310	+	#919192 Pale Blue	#8B8940 Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB15310	+	#919192 Pale Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB1929	+	#919192 Pale Blue	#05265B Vivid Purplish Red	#CCA817 Strong Greenish Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี

The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบน อาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB22310	+	#919192 Pale Blue	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2539	+	#919192 Pale Blue	#FFDB8B Pale Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2939	+	#919192 Pale Blue	#7A7666 Greenish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB30310	+	#919192 Pale Blue	#B32851 Strong Purplish Red	#A86540 Light Brown
	MDB3222	+	#919192 Pale Blue	#AB343A Moderate Red	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB3322	+	#919192 Pale Blue	#A47C45 Dark Grayish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB40310	+	#919192 Pale Blue	#CCA817 Strong Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB4123	+	#4A545C Graying Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	#CCA817 Strong Greenish Yellow
	MDB822	+	#4A545C Graying Blue	#9F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลท ด้วยระบบสี

The NBS/IBCC Color System

กลุ่ม	หมายเลข ไอโซเลท	เจริญบนอาหาร Starch casein agar	สีเส้นใยบน ผิวหน้าอาหาร	สีเส้นใยใต้อาหาร	สีของรงควัตถุ
4	MDB39310	+	#4A545C Graying Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB632	+	#4A545C Graying Blue	#7F8F18 Strong Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB36310	+	#4A545C Graying Blue	#C4A55F Grayish Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB2510	+	#4A545C Graying Blue	#7D746D Bluish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB1025	+	#464544 Dark Bluish Gray	#8F8200 Deep Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
	MDB1228	+	#464544 Dark Bluish Gray	#FFD35F Light Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้
5	MDB342	+	#88706B Purplish Gray	#CED23A Brilliant Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

สำหรับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างบริเวณดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี (ดังวิธีการที่ 3.6.7) มีการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 5 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบการตกตะกอน (Coagulation) ในหลอดอาหาร 10% skim milk, การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) บนอาหาร Skim milk agar, การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction), การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction), และ การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท 41 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี สามารถจัดกลุ่มเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Casein hydrolysis	Coagulation			
1	MDB31310	-	-	w	w	-
2	MDB548	-	w	-	-	w
	MDB11210	w	-	+	-	++
	MDB3422	-	+	+	-	-
	MDB3528	-	w	+	-	-
	MDB925	-	+	+	-	+++
	MDB148	+	+	-	w	w
3	MDB2739	-	-	+	+	-
	MDB2839	w	-	+	+	-
4	MDB17310	-	-	+	w	-
	MDB2029	-	w	+	-	-
	MDB23310	-	-	w	-	-
	MDB2433	+	w	w	-	-
	MDB2639	-	w	+	+	-
	MDB16310	-	w	+	-	-
	MDB1829	w	w	+	-	-
	MDB21210	+	w	+	-	w
	MDB432	w	+	+	-	+
	MDB732	-	+	-	+	w
	MDB13310	-	w	w	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนไมซีต

กลุ่มเชื้อ	หมายเลข ไอโซเลต	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Casein hydrolysis	Coagulation			
4	MDB14310	-	+	-	+	-
	MDB37310	-	-	w	-	-
	MDB38310	-	-	+	-	-
	MDB15310	-	-	-	w	-
	MDB1929	-	-	w	-	-
	MDB22310	-	+	+	+	-
	MDB2539	-	w	-	-	+
	MDB2939	-	w	+	+	-
	MDB30310	-	w	+	w	-
	MDB3222	+	w	-	+	-
	MDB3322	w	-	+	-	-
	MDB40310	-	w	+	-	-
	MDB4123	+	-	+	-	-
	MDB822	-	+	-	-	-
	MDB39310	-	-	+	-	-
	MDB632	+	w	-	-	-
	MDB36310	-	-	-	w	-
	MDB2510	-	-	+	-	-
	MDB1025	-	+	+	-	w
	MDB1228	-	w	+	-	-
5	MDB342	-	+	W	-	-

หมายเหตุ : + = positive reaction , - = negative reaction , w = weakly positive reaction

ความแตกต่างของวิธีการทดสอบโดย Coagulation , Casein hydrolysis และ Gelatin liquefaction คือวิธี Coagulation เป็นการทดสอบการตกตะกอนเคซีนในน้ำนมสามารถแยกออกจากน้ำนมโดยการตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนิน (rennin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ (enzyme) ชนิดโปรติเอส (protease) สามารถย่อยเคซีนให้มีโมเลกุลเล็กลงโดยเรนินจะย่อยเคซีน แล้วรวมกับแคลเซียมไอออน แยกตัวออกมาเป็นตะกอนขาวขุ่น (พิมพ์เพ็ญ, 2556) สำหรับวิธี Casein hydrolysis เป็นการทดสอบการย่อยสลายโปรตีน เพื่อดูว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เป็นเอนไซม์ที่สลายโปรตีนได้หรือไม่ ซึ่งเอนไซม์นี้ใช้ในการศึกษาเพื่อหาว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่สลายโปรตีนได้หรือไม่หรือไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

exoenzyme ได้หรือไม่ โดยมีการใช้เอนไซม์โคซิเนส เอนไซม์โคซิเนสจะหลั่งออกมาจากเซลล์ (exoenzyme) เข้าไปในตัวกลางซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของโปรตีนนมที่เรียกว่าเคซีน และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อจากเดิมที่มีความข้นของนม ทำให้โปรตีนเคซีนเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้และมีความโปร่งใส (ว่งใส) ซึ่งเคซีนถูกจัดให้เป็นโปรตีนชนิด ฟอสโฟโปรตีน (Reynolds, 2011) ส่วนการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการผลิต proteolytic enzyme โดยการใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ซึ่งเจลาตินนั้นเป็นอนุพันธ์ของโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) เจลาตินประกอบด้วย extracellular enzymes ที่ผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเพื่อทำการย่อยสลายเจลาติน ตรวจสอบโดยเจลาตินจะเกิดการแข็งตัวของอาหาร ถ้าเจลาตินไม่แข็งตัวเกิดจากจุลินทรีย์ไม่มีการผลิตเอนไซม์ (Leboffe and Pierce, 2011)

4.3 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15

จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 41 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างบริเวณดินนาเกลือ นำมาทำการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 41 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46 และร้อยละ 3, เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 36 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5, เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 30 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 และเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 9 ไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 9 ส่วนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 12 และความเข้มข้นของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 ไม่พบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15

กลุ่ม	หมายเลข ไอ โซเลข	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)						
		0.46	3	5	7	9	12	15
1	MDB31310	+++++	+++	+++	+++++	++	-	-
2	MDB548	+++++	+++	+++	++	-	-	-
	MDB11210	+++++	+++	+++	+	-	-	-
	MDB3422	+++++	++++	+++	-	-	-	-
	MDB3528	+++++	+++	+	-	-	-	-
	MDB925	+++++	++++	+++	-	-	-	-
	MDB148	++++	+++	-	-	-	-	-
3	MDB2739	+++++	+	-	-	-	-	-
	MDB2839	+++	+	+	+	+	-	-
4	MDB17310	+++++	+++	++	++	-	-	-
	MDB2029	+++++	++	++	+	+	-	-
	MDB23310	+++++	+++	++++	++	-	-	-
	MDB2433	++++	++++	++	++	+++	-	-
	MDB2639	+++++	+++	++	++	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 3 , 5 , 7 , 9 , 12 และ 15

กลุ่ม	หมายเลข ไอ โซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)						
		0.46	3	5	7	9	12	15
4	MDB16310	+++++	++	++	-	-	-	-
	MDB1829	+++++	+	+	-	-	-	-
	MDB21210	+++++	+++	+++	++	-	-	-
	MDB432	+++++	++++	+++	++	-	-	-
	MDB732	+++++	+++	+++	++	-	-	-
	MDB13310	+++++	++++	++++	++	+	-	-
	MDB14310	+++++	++	++	++	-	-	-
	MDB37310	++++	++++	++++	+++	++	-	-
	MDB38310	++++	++++	++	++	++	-	-
	MDB15310	+++++	+++++	++++	++++	-	-	-
	MDB1929	++++	+++++	+++	+++	-	-	-
	MDB22310	+++++	++++	+++	+++	-	-	-
	MDB2539	+++++	++++	+++	++	-	-	-
	MDB2939	+++	++	+	+	-	-	-
	MDB30310	+++++	+++++	++++	+++	-	-	-
	MDB3222	+++++	+++	++++	++	-	-	-
	MDB3322	+++++	+++	+++	++	-	-	-
	MDB40310	+++++	++++	++++	++	++	-	-
	MDB4123	+++++	++++	+++	+	-	-	-
	MDB822	+++++	+++	+++	++	++	-	-
	MDB39310	+++++	++++	-	-	-	-	-
	MDB632	+++++	++	+++	-	-	-	-
	MDB36310	++++	++++	++++	-	-	-	-
	MDB2510	+++++	++++	-	-	-	-	-
	MDB1025	+++++	+++++	+++	++	-	-	-
	MDB1228	+++++	+++++	+++++	++++	-	-	-
5	MDB342	+++++	++++	-	-	-	-	-

*** หมายถึง อัตราการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- +++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีมาก
- ++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดี
- +++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ปานกลาง
- ++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อย
- + หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อยมาก
- หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญไม่ได้

จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จัดเป็นแอคติโนมัยซีทพวกชอบเกลือปานกลาง (moderately halophilic actinomycetes) เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.46-9.0 (Kushner, 1978) และจากงานวิจัยของ Rajan *et al.* (2010) พบว่าจากเชื้อที่คัดแยกได้จำนวน 93 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่หรือร้อยละ 75 ของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 3.0-10.0 จึงจัดเป็นจุลินทรีย์พวกชอบเค็มปานกลาง

4.4 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) เพื่อทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากผลการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จำนวน 41 ไอโซเลท ในตารางที่ 4.4 ได้ทำการวัดความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โดยวัดค่าความกว้างของการเกิดเคลียร์โซนบนอาหารแข็ง เพื่อทำการเปรียบเทียบและหาตัวแทนไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป และเมื่อทำการวัดค่าความกว้างของการเกิดเคลียร์โซน พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB 925 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดโดยมีขนาดเคลียร์โซนกว้างที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 22.14 มิลลิเมตร แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลความสามารถการย่อยสลายแป้งของไอโซเลตต่างๆ

หมายเลขไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
MDB548	11.24	10.10	10.67
MDB11210	18.98	18.31	18.62
MDB925	22.93	21.34	22.14
MDB148	7.79	10.89	9.34
MDB21210	13.34	13.24	13.29
MDB432	15.74	14.79	15.72
MDB732	11.72	10.49	11.10
MDB2539	10.88	15.13	13.00
MDB1025	12.10	11.76	11.93



รูปที่ 4.42 ผลความสามารถการย่อยสลายแป้งของไอโซเลตที่ MDB925 ที่มีการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดบนอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) (ขนาดเฉลี่ยโซนกว้างที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 22.14 มิลลิเมตร)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่ MDB925 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Inorganic salts-starch agar (ISP4) ที่ปรับความเข้มข้นของ Soluble Starch ที่ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมคือ International *Streptomyces* Project เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ISP2) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอกก่อน แต่ปรากฏผลว่าอาหาร ISP4 ที่ปรับความเข้มข้นของ Soluble Starch ที่ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 นั้นอาหารมีความชุ่ม สีขาวของแป้ง และแป้งที่เติมลงไปรบกวนการกรองเพื่อการวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงได้ทดลองเพิ่มเติมโดยปรับสูตรอาหารให้เป็นสูตรปกติของอาหาร ISP4 คือความเข้มข้นของ Soluble Starch ที่ร้อยละ 1 แต่ก็ยังพบกับปัญหาเดิม จึงสรุปได้ว่าไม่สามารถหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลว Inorganic salts-starch agar (ISP4) ได้ การตรวจวัดการใช้แป้งที่ดีที่สุดจึงใช้การวัดขนาดของเซลล์รีโชนบนอาหารแข็ง ISP4 นั้นเอง

หลังจากนั้นนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อไอโซเลตนี้ โดยการแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่แตกต่างกัน คือ 7, 8, 9 และ 10

การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ คือ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

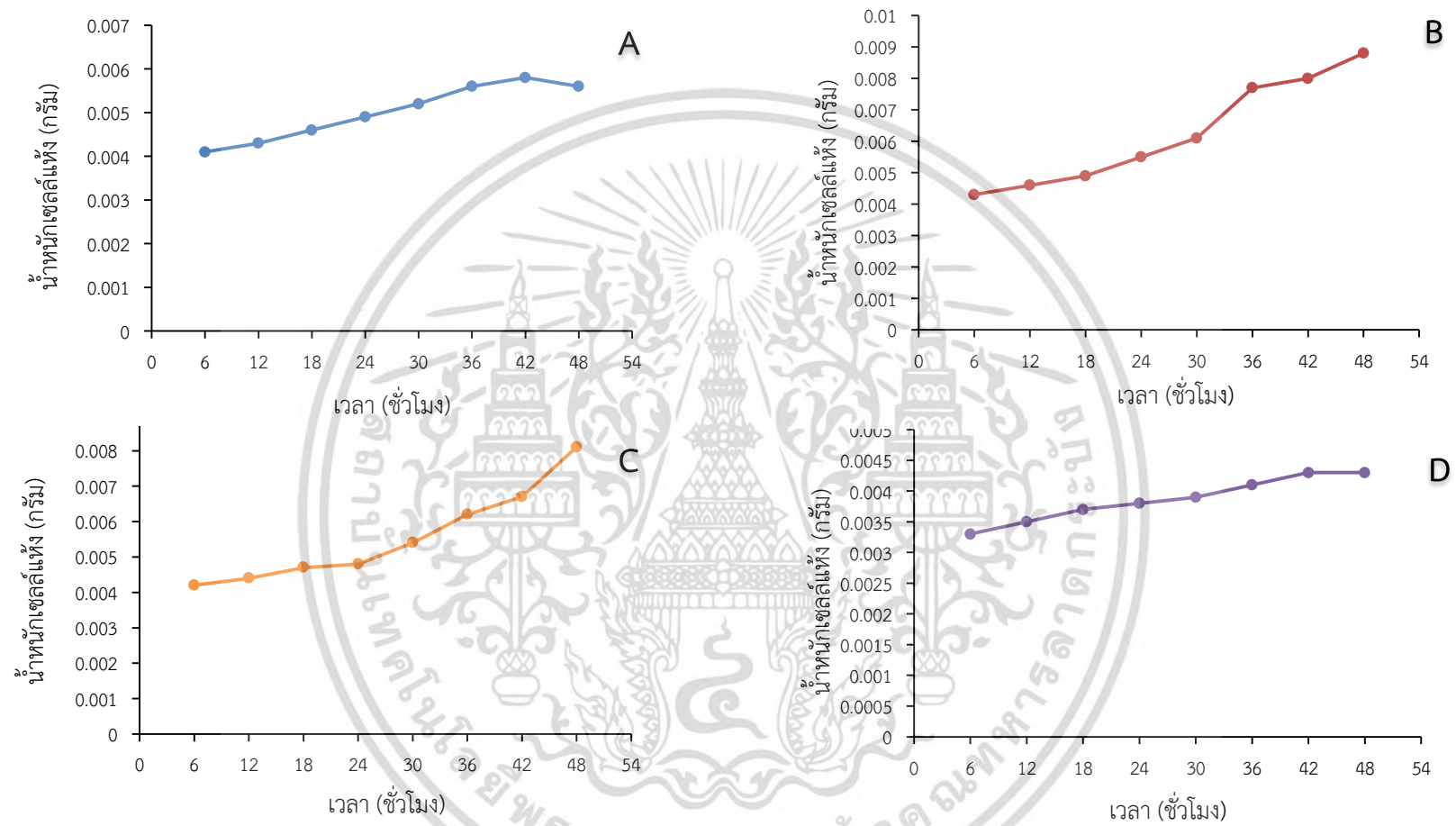
การทดลองที่ 3 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่แตกต่างกัน คือ 7, 8, 9 และ 10

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่แตกต่างกันคือ 7, 8, 9 และ 10 พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่ระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 8 มีการเจริญได้ดีที่สุด เนื่องจากมีช่วง log phase (Range of date) ที่สามารถนำมาคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ค่ามากที่สุด และคำนวณค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ได้ค่าน้อยที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.43 ถึงรูปที่ 4.45

ตารางที่ 4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ที่ระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ต่างกัน

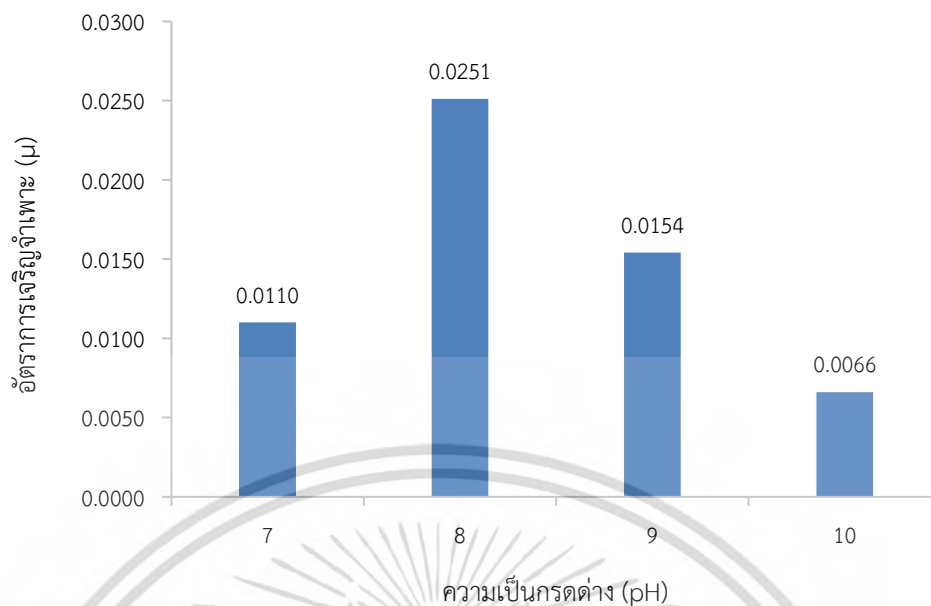
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	Range of date	Specific growth rate (μ) (ชั่วโมง)	Doubling time (t_d)
7	12 - 36	0.0110	63.0134
8	18 - 36	0.0251	27.6096
9	18 - 36	0.0154	45.0000
10	12 - 36	0.0066	105.0000



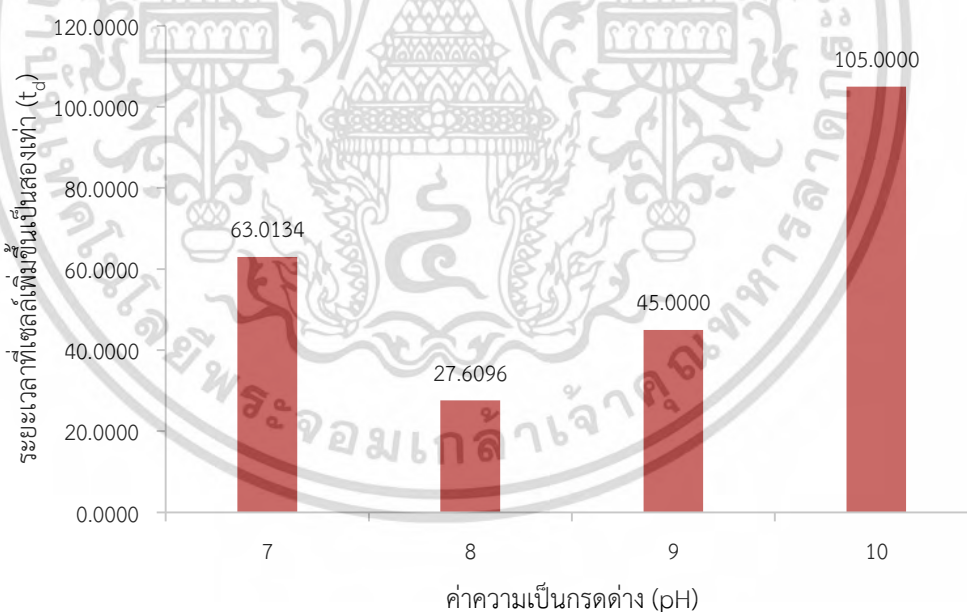
แสดง

รูปที่ 4.43

ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces Project* (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ 7 (A), 8 (B), 9 (C) และ 10 (D)



รูปที่ 4.44 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) คือ 7, 8, 9 และ 10



รูปที่ 4.45 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) คือ 7, 8, 9 และ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองที่ 1 การศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่แตกต่างกันคือ 7, 8, 9 และ 10 โดยวิเคราะห์ผลการเจริญจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.43-4.45) จากนั้นนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) จากตารางที่ 4.7 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เป็น 8 เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงที่สุด เท่ากับ 0.0251 ชั่วโมง (รูปที่ 4.44) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ต่ำที่สุด เท่ากับ 27.6096 (รูปที่ 4.45) ซึ่งจากผลการทดลองได้สอดคล้องกับงานวิจัยของชลธิชา และคณะ (2553) ในหัวข้อการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในส่วนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในช่วง 4-9 รายงานว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ดีในค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในช่วง 8-9

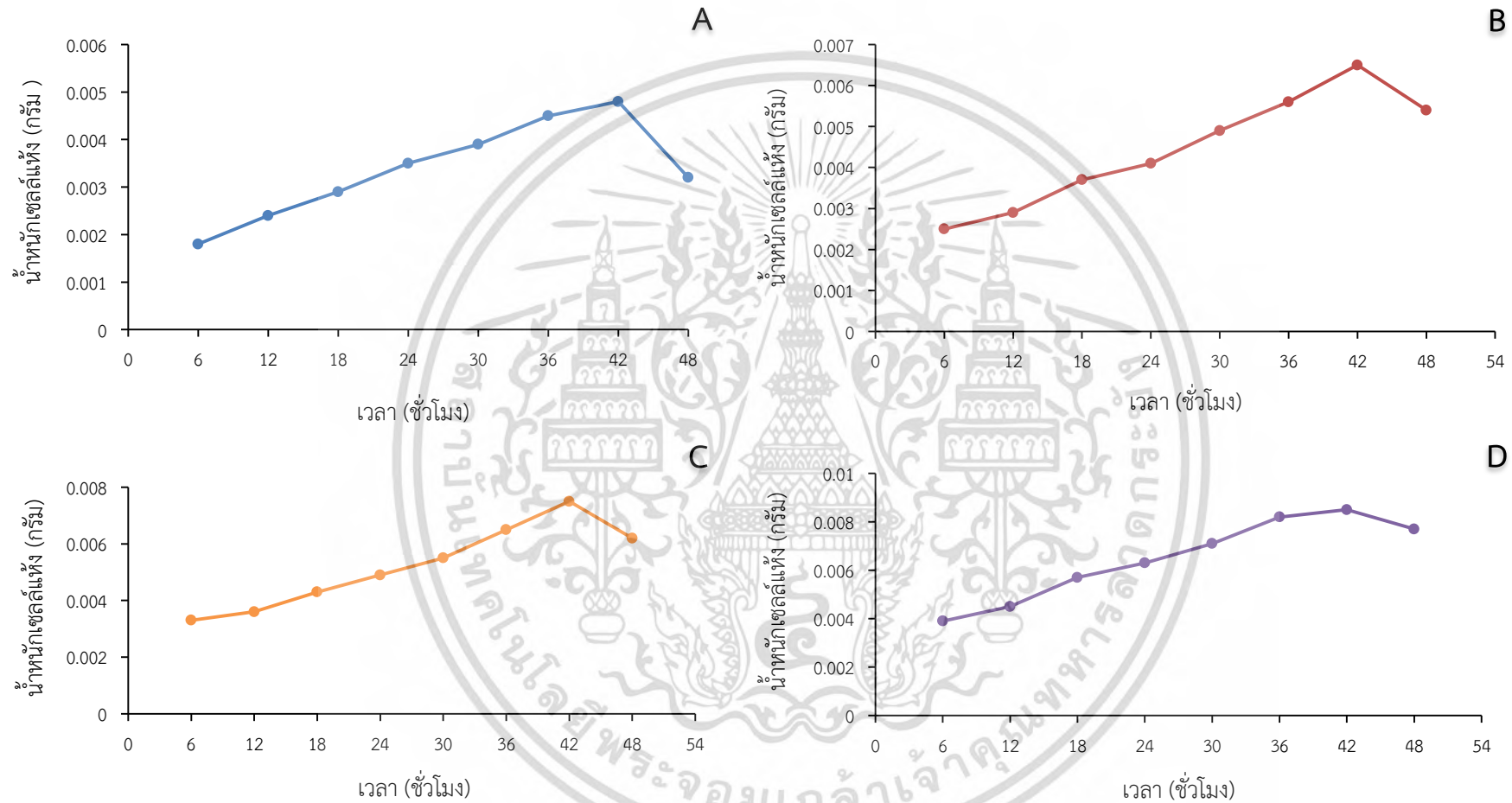
การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ คือ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ ร้อยละ คือ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่ระดับค่าความเข้มข้น 0% NaCl มีการเจริญได้ดีที่สุด เนื่องจากมีช่วง log phase (Range of date) ที่สามารถนำมาคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ค่ามากที่สุด และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ได้ค่าน้อยที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.46 ถึงรูปที่ 4.48

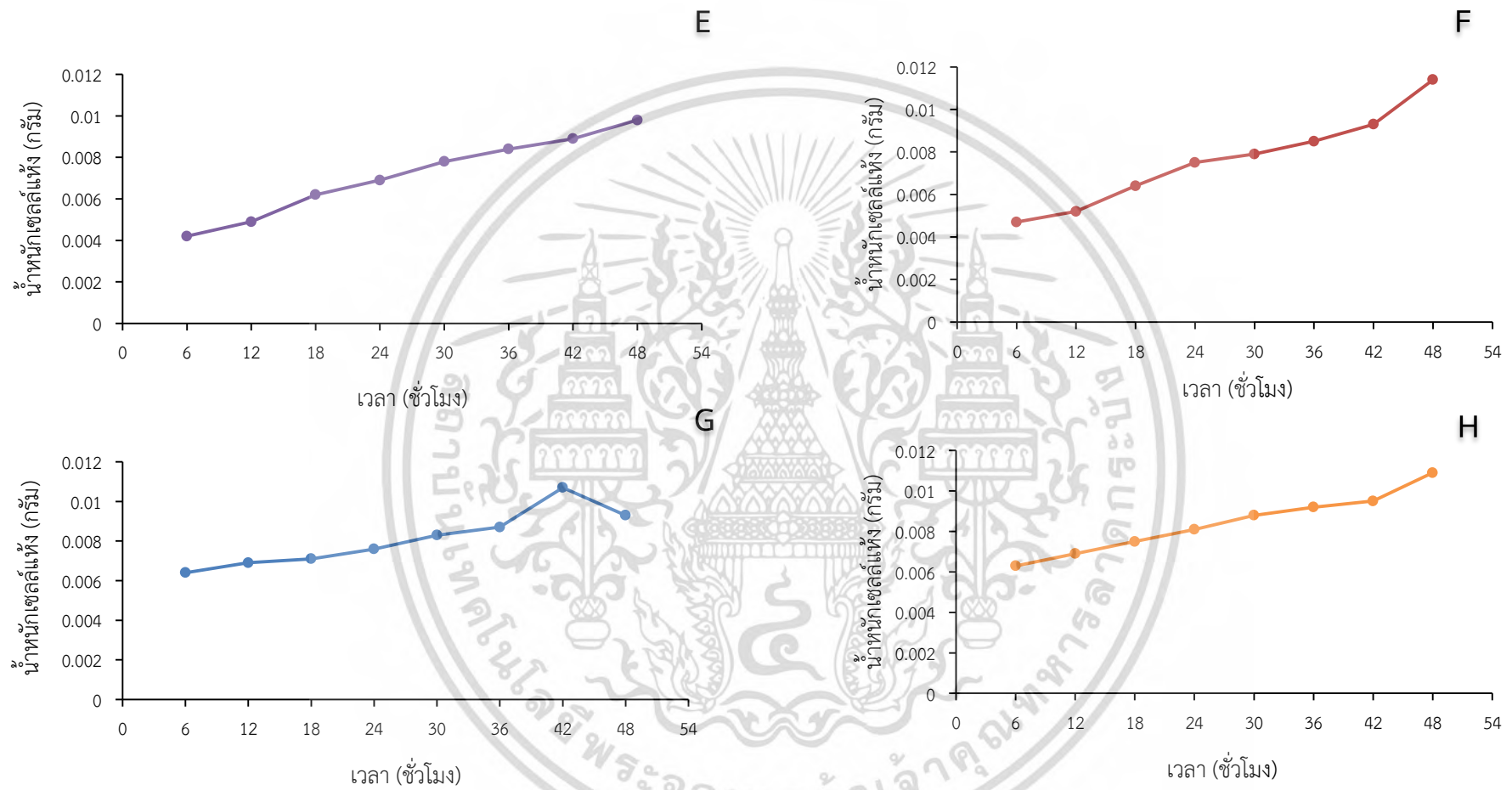
ตารางที่ 4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ MDB925 ที่ระดับความเข้มข้น NaCl ที่ต่างกัน

ค่าความเข้มข้น NaCl ร้อยละ	Range of date	Specific growth rate (μ) (ชั่วโมง)	Doubling time (t_d)
0	18 - 36	0.0244	28.4016
0.5	12 - 30	0.0230	30.1304
1	18 - 30	0.0205	33.8050
2	12 - 36	0.0250	27.7200
3	12 - 36	0.0225	30.8000
4	12 - 36	0.0273	25.3846
5	18 - 30	0.0130	53.3076
6	18 - 30	0.0133	52.1052

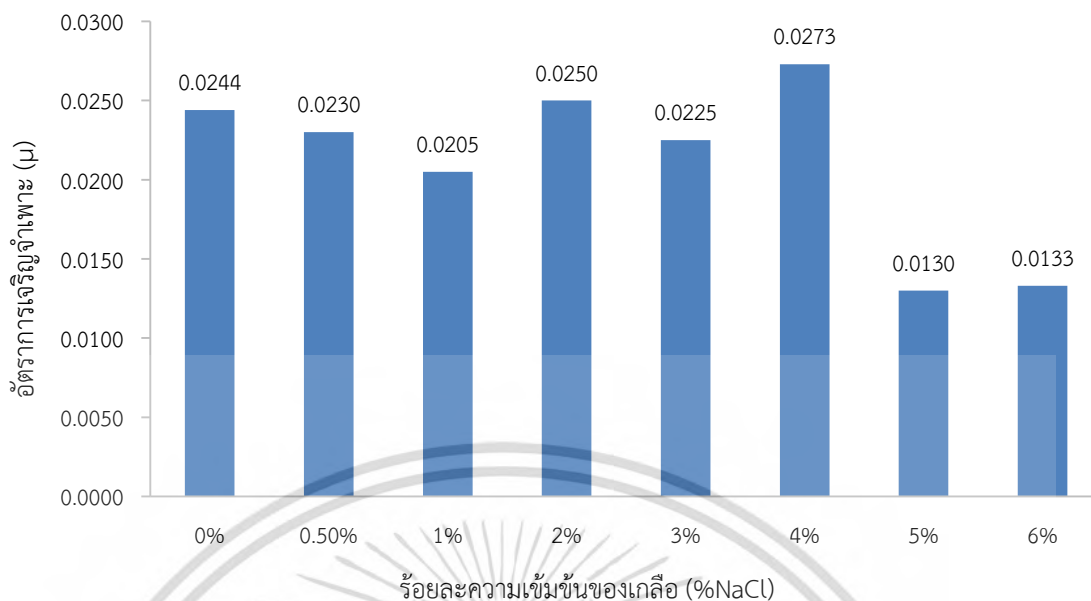
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



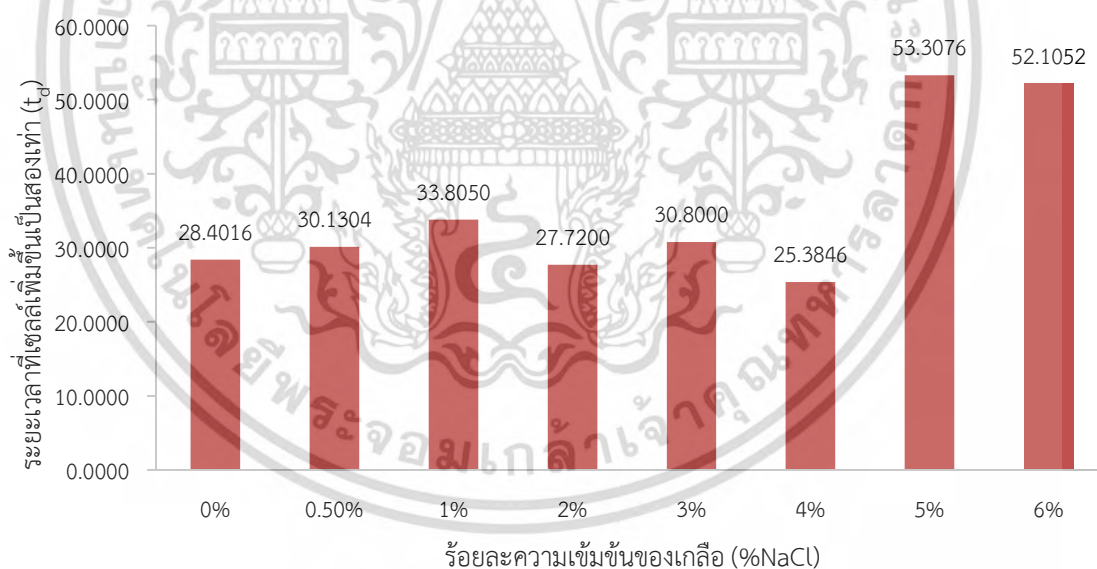
รูปที่ 4.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0 (A), 0.5 (B), 1 (C) และ 2 (D) NaCl



รูปที่ 4.46 (ต่อ) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ BBA 1453 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 3 (E), 4 (F), 5 (G) และ 6 (H) NaCl



รูปที่ 4.47 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6



รูปที่ 4.48 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับค่าความเข้มข้น NaCl คือร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยวิเคราะห์ผลการเจริญจากค่าจำนวนเซลล์แห้ง ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.46-4.48) จากนั้นนำค่าจำนวนเซลล์แห้งในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) จากตารางที่ 4.8 พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีค่าความเข้มข้นเป็น 4% NaCl เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงที่สุด เท่ากับ 0.0273 ชั่วโมง (รูปที่ 4.47) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ต่ำที่สุด เท่ากับ 25.3846 (รูปที่ 4.48) ซึ่งจากผลการทดลองได้สอดคล้องกับงานวิจัยของลักษมี (2556) ในหัวข้อการวิจัย เรื่องการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ รายงานว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทสกุล *Saccharothrix* สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ระหว่าง 2-4% แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl คือ 4%

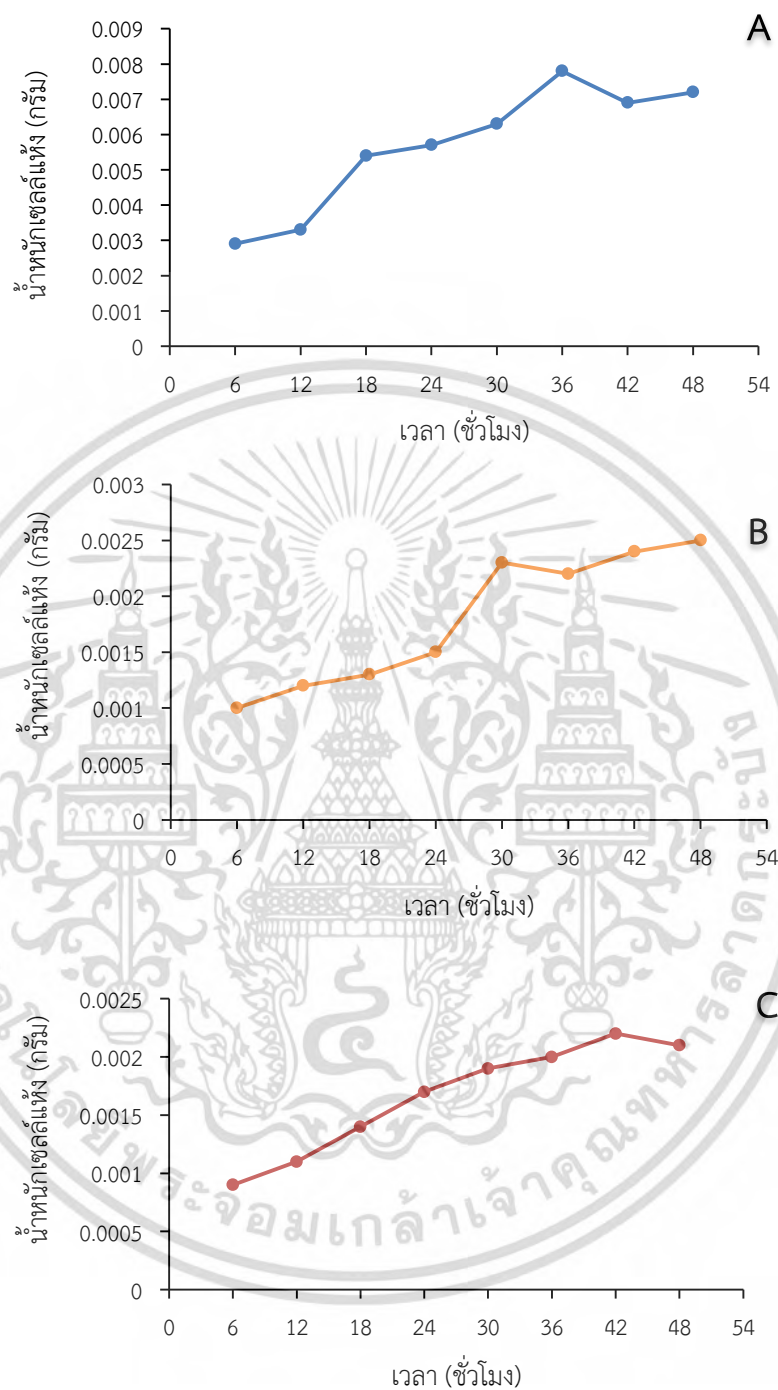
การทดลองที่ 3 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ที่คำนวณจากค่าจำนวนเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญได้ดีที่สุด เนื่องจากมีช่วง log phase (Range of date) ที่สามารถนำมาคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ค่ามากที่สุด และคำนวณค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ได้ค่าน้อยที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 4.9 รูปที่ 4.49 ถึงรูปที่ 4.51

ตารางที่ 4.9 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ที่ระดับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน

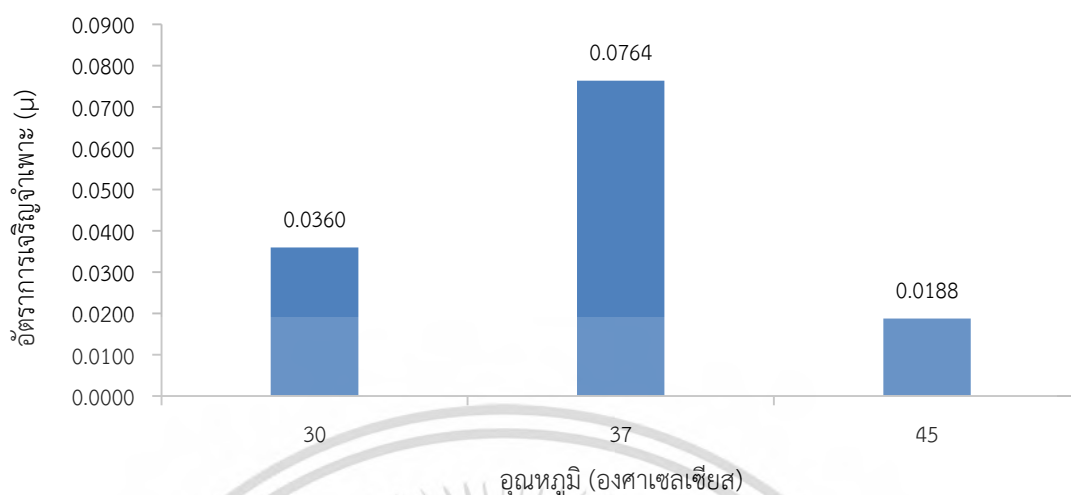
ค่าอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Range of date	Specific growth rate (μ) (ชั่วโมง)	Doubling time (t_d)
30	12 - 30	0.0360	19.2500
37	12 - 36	0.0764	9.0701
45	18 - 42	0.0188	36.8617

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

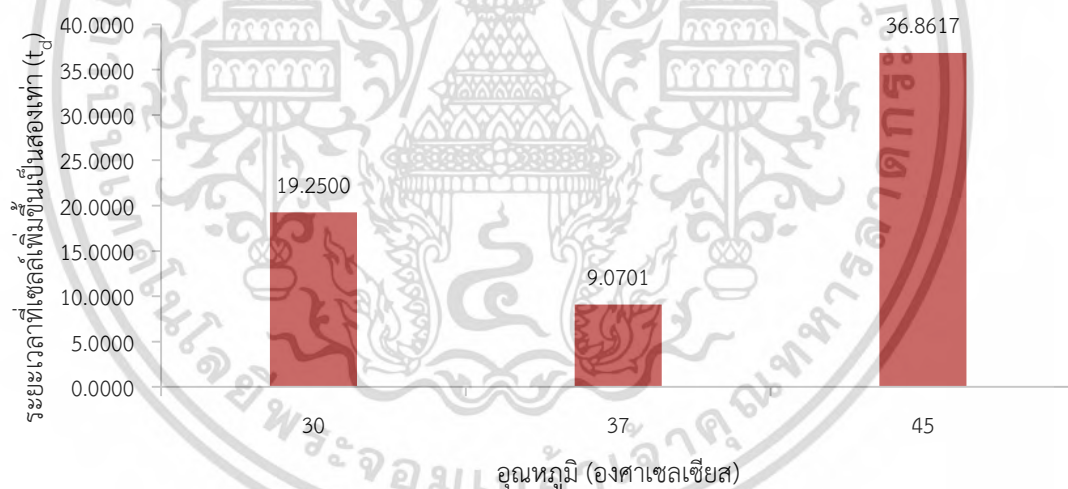


รูปที่ 4.49 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนชั่วโมงของการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 (A), 37 (B) และ 45 (C) องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.50 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.51 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 จากการทดลองที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 3 จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) โดยเฉพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ผลการเจริญจากค่าจำนวนเซลล์แห้ง ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.49-4.51) จากนั้นนำค่าจำนวนเซลล์แห้งในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: t_d) จากตารางที่ 4.9 พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB925 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงที่สุด เท่ากับ 0.0764 ชั่วโมง (รูปที่ 4.54) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (t_d) ต่ำที่สุด เท่ากับ 9.0701 (รูปที่ 4.55) ซึ่งจากผลการทดลองได้สอดคล้องกับงานวิจัยของชลธิชา และคณะ (2553) ในหัวข้อการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอสคิโนมัยซีท ในส่วนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีท โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง คือ 20, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส รายงานว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase

จากการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแอสคิโนมัยซีทเบื้องต้นทั้งหมด 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินนาเกลือ ในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ด้วยอาหาร Modified M-9 ผสม phenol red ร้อยละ 0.009 (Gulati *et al.*, 1996) พบว่าเชื้อสายพันธุ์ K6786-3, MDB 925, MDB 2539, MDB 31310, MDB 3222, MDB 148, MDB 1025, MDB 21210, MDB 30310, MDB 11210, MDB 548, MDB 732, MDB 432 และ MDB 1929 ไม่มีการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ซึ่งตรวจสอบจากการสร้าง clarity of zone สีชมพูแดงส้ม ของ phenol red บนอาหาร Modified M-9 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Gulati *et al.*, 1996) เนื่องจากเอนไซม์ L-asparaginase มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute lymphoblastic leukaemia) ในเด็ก (Wriston และ Yellin, 1973) แสดงดังรูปที่ 4.52



รูปที่ 4.52 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด 14 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น

(Pre-Test)

ทำการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 41 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (Pre-test) ดังวิธีการที่ 3.10 ดังตารางที่ 4.9 ดังแสดงรูปที่ 4.53 - 4.56



รูปที่ 4.53 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่

Micrococcus luteus TISTR 2374 (A), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B), *Escherichia coli* ATCC 25922 (C), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (E) และ *Candida albicans* ATCC 90028 (F)

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

หมายเลข ไอโซเลต	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มิลลิเมตร)													
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>M. luteus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>C. albicans</i>	
	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย
MDB38310	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB23310	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB3422	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB3322	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB40310	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB1025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB2433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB2510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDB16310	-	-	5.5	4.5	-	-	9.5	9	5.5	5	7.5	7.5	-	-
MDB39310	9.5	7	7.5	5.5	-	-	10.5	6.5	7.5	6.5	10.5	9.5	-	-
MDB822	18	20	12.5	10.5	-	-	8.5	8	-	-	5.5	5.5	8.5	8.5
MDB13310	9	5	4	2	-	-	9	9	6.5	2.5	6.5	5.5	-	-

จากการทดสอบพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิดได้ ดังตารางที่ 4.9 และมีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบดังนี้

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB39310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 8.25 มิลลิเมตร, MDB822 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 19 มิลลิเมตร, MDB13310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7 มิลลิเมตร, MDB148 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7.25 มิลลิเมตร, MDB342 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6.5 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 19.5 มิลลิเมตร

2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB16310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 5 มิลลิเมตร, MDB39310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6.5 มิลลิเมตร, MDB822 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 11.5 มิลลิเมตร, MDB13310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 3 มิลลิเมตร, MDB17310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 4.25 มิลลิเมตร, MDB148 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 4 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 11 มิลลิเมตร

3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 12.5 มิลลิเมตร

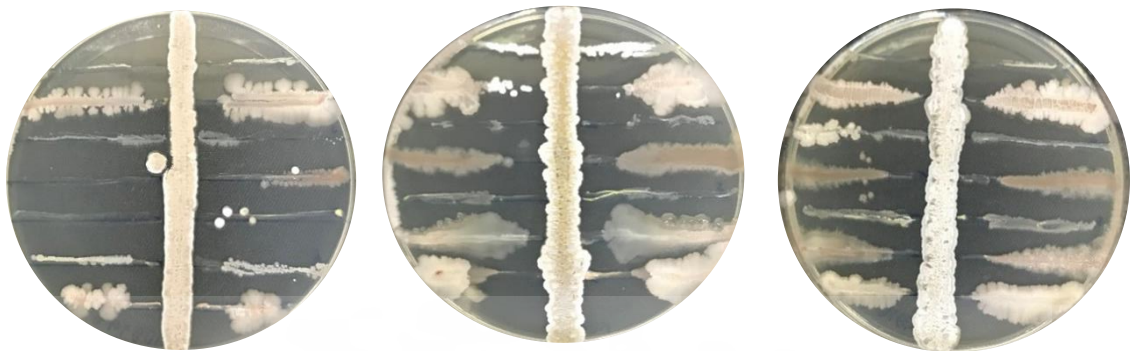
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB16310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 9.25 มิลลิเมตร, MDB39310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 8.5 มิลลิเมตร, MDB822 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 8.25 มิลลิเมตร, MDB13310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 9 มิลลิเมตร, MDB17310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 9 มิลลิเมตร, MDB148 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7.25 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7.5 มิลลิเมตร

5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB16310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 5.25 มิลลิเมตร, MDB39310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7 มิลลิเมตร, MDB13310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 4.5 มิลลิเมตร, MDB17310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6.5 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 30 มิลลิเมตร

6. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB16310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 7.5 มิลลิเมตร, MDB39310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 10 มิลลิเมตร, MDB822 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 5.5 มิลลิเมตร, MDB13310 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6 มิลลิเมตร, MDB148 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6.5 มิลลิเมตร, MDB925 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 30 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 2 มิลลิเมตร

7. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท MDB822 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 8.5 มิลลิเมตร, MDB148 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 6.25 มิลลิเมตร และ MDB1228 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 10.5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.54 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท
ที่ MDB148 (ก), ไอโซเลทที่ MDB822 (ข) และไอโซเลทที่ MDB13310 (ค)



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.55 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท
ที่ MDB39310 (ก), ไอโซเลทที่ MDB16310 (ข) และไอโซเลทที่ MDB17310 (ค)



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.56 แสดงผลการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไอโซเลท
ที่ MDB342 (ก), ไอโซเลทที่ MDB925 (ข) และไอโซเลทที่ MDB1228 (ค)

4.7 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยซีท ได้แก่ MDB148, MDB822, MDB13310, MDB39310, MDB16310, MDB17310, MDB342, MDB925 และ MDB1228 มาทำการทดสอบการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Agar disc diffusion โดยใช้ทำการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตต และสกัดน้ำหมักจากเซลล์และเส้นใยด้วยเมทานอลจากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิค agar disc diffusion โดยการนำสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงไปบนแผ่น disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำมาวางบนผิวหน้าอาหาร MHA (Muller Hinton agar) สำหรับแบคทีเรีย และบนผิวหน้าอาหาร SDA (Sabouraud dextrose agar) สำหรับยีสต์ ที่มีการ swab จุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ไว้ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion

หมายเลข ไอโซเลท	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)						
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MDB148	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-
MDB822	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ B = สารสกัดหยาบของน้ำหมัก, C = สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใย, - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)						
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MDB13310	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-
MDB39310	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ B = สารสกัดหยาบของน้ำหมัก, C= สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใย, - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)						
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MDB16310	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-
MDB17310	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ B = สารสกัดหยาบของน้ำหมัก, C= สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใย, - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลต	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)						
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MDB342	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-
MDB925	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ B = สารสกัดหยาบของน้ำหมัก, C= สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใย, - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

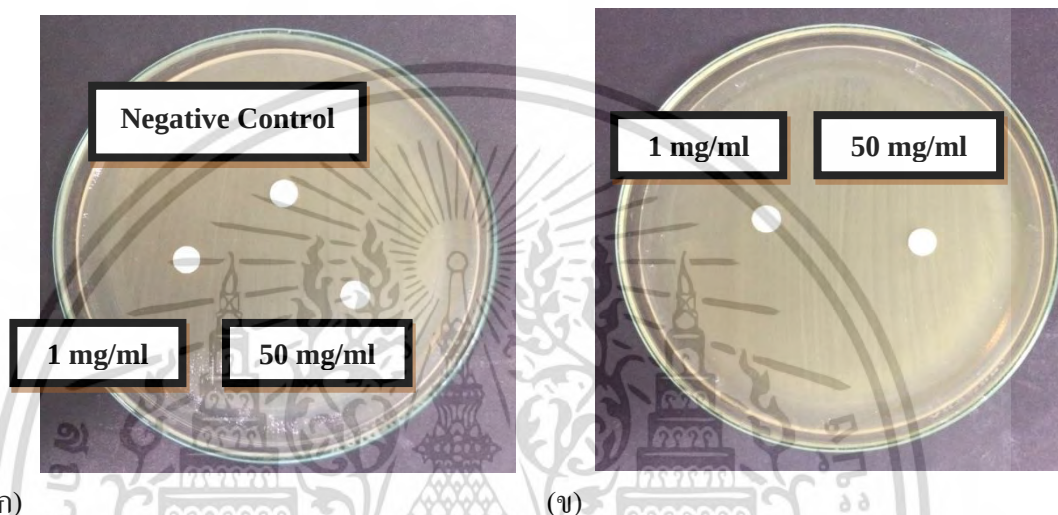
ตารางที่ 4.11 (ต่อ) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจากสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ในระดับความเข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลต	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร)						
		<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MDB1228	B 1	-	-	-	-	-	-	-
	B 50	-	-	-	-	-	-	-
	C 1	-	-	-	-	-	-	-
	C 50	-	-	-	-	-	-	-

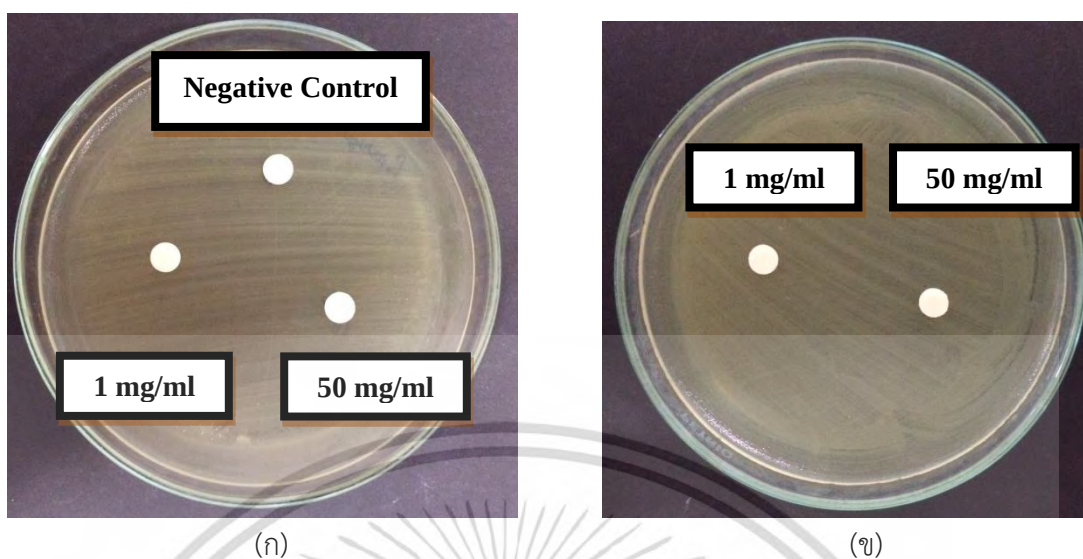
*** หมายเหตุ B = สารสกัดหยาบของน้ำหมัก, C = สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใย, - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Esechrichia coli* ATCC 25922 พบว่า แอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Esechrichia coli* ATCC 25922 ดังแสดงรูปที่ 4.58



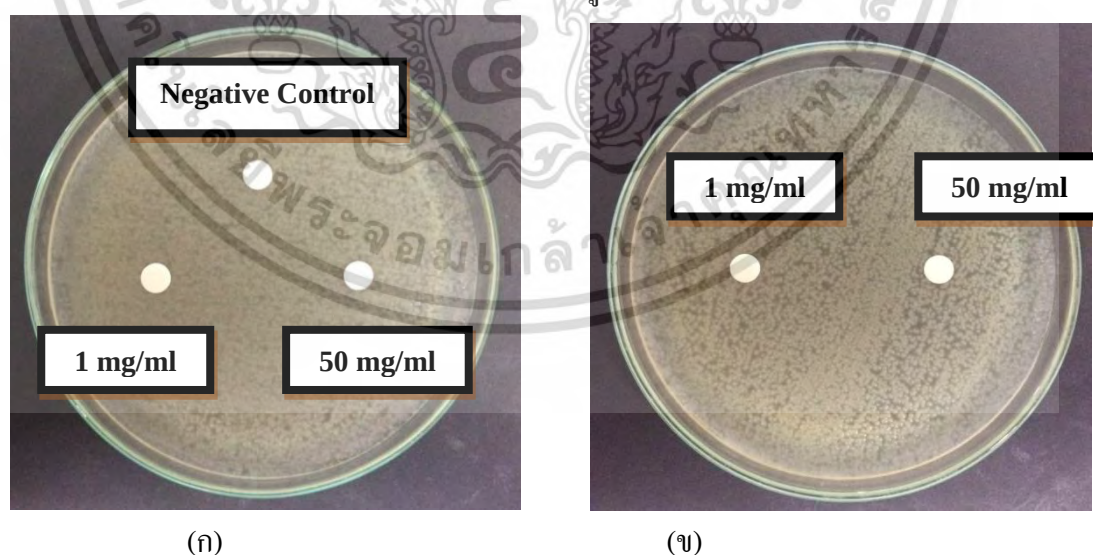
รูปที่ 4.57 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข) จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ B8810-1 ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังนั้น เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทจึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ดังแสดงรูปที่ 4.58



รูปที่ 4.58 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข)

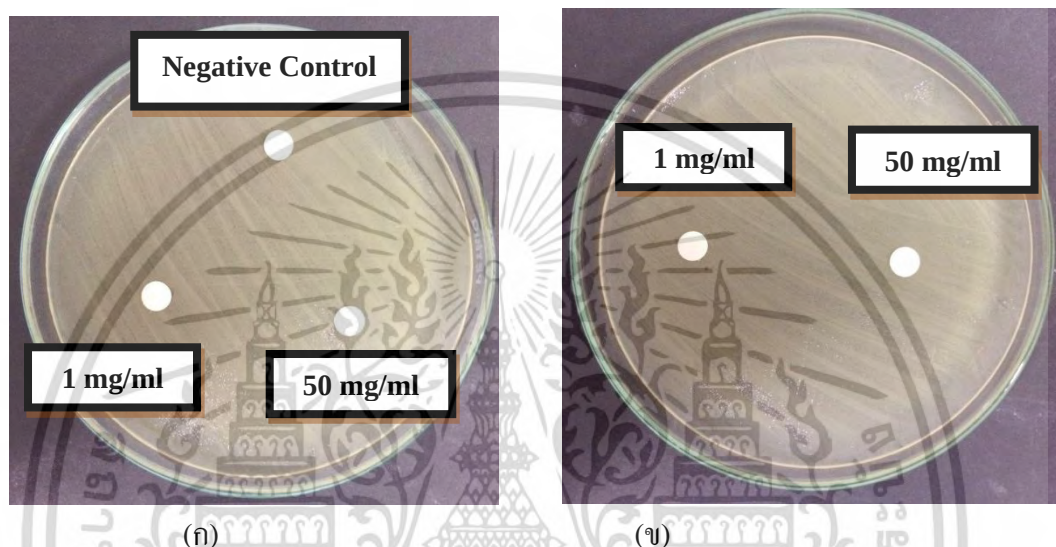
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดังแสดงรูปที่ 4.59



รูปที่ 4.59 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข)

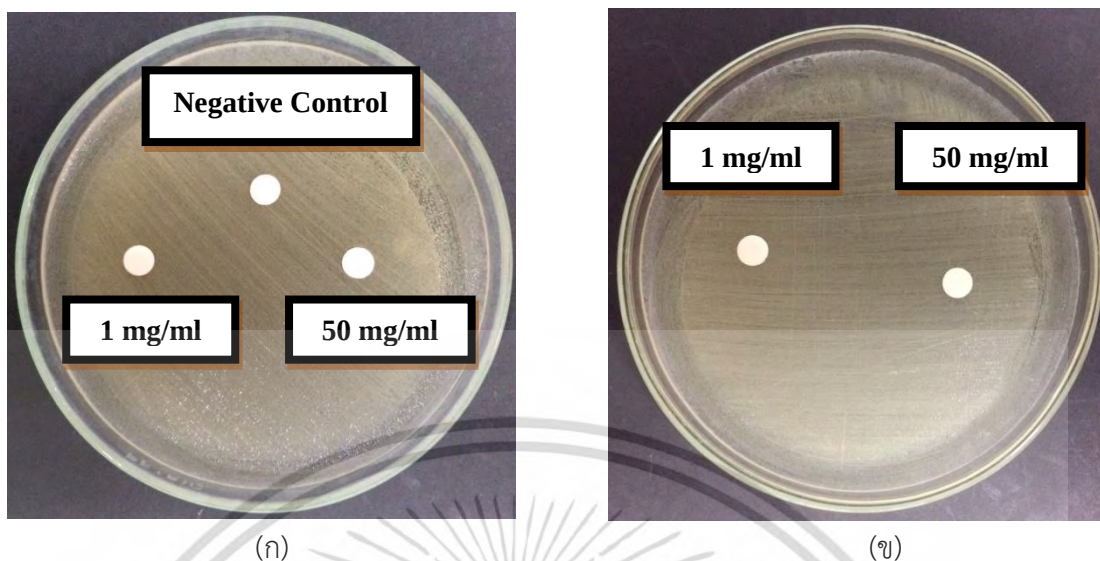
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ดังแสดงรูปที่ 4.60



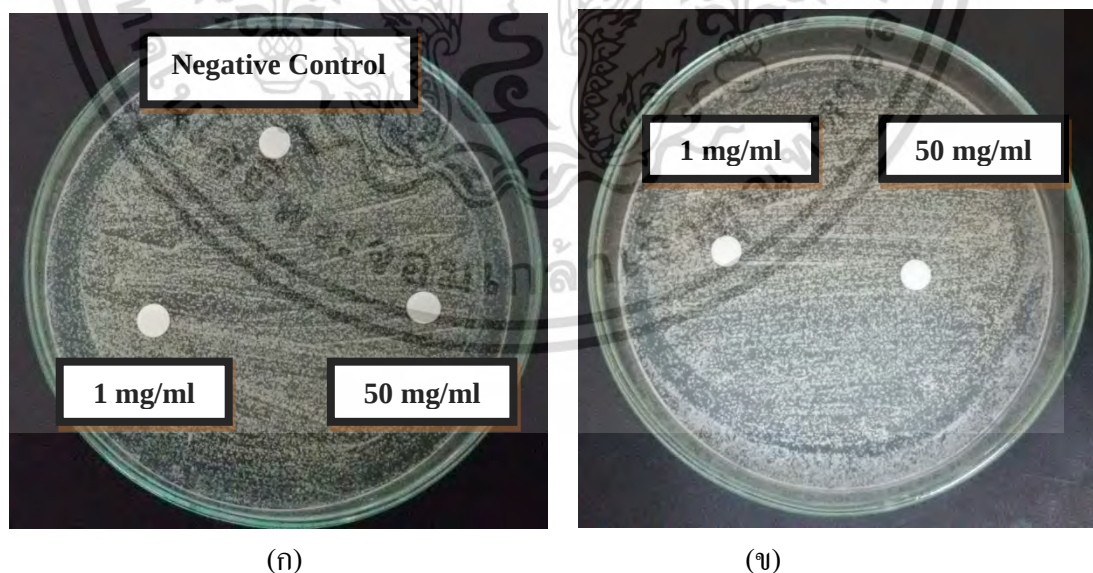
รูปที่ 4.60 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข)

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ จึงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ดังแสดงรูปที่ 4.61



รูปที่ 4.61 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคทีโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข)

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า ไม่เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหารจากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อแอคทีโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังแสดงรูปที่ 4.62



รูปที่ 4.62 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 จากสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต (ก) และสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อ แอคทีโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) (Nakajima *et al.*, 1999)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 41 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 7 ไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานที่น่าสนใจ คือ ไอโซเลท MDB40310, ไอโซเลท MDB1228, ไอโซเลท MDB1929, ไอโซเลท MDB3222, ไอโซเลท MDB822, ไอโซเลท MDB2029 และ MDB30310 จึงทำการคัดเลือกเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทนี้ไปทำการศึกษากำหนดลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) โดย DNA จะถูกสกัดโดยใช้วิธี Colony PCR ยีน 16S rRNA ถูก amplify โดยใช้ไพรเมอร์ คือ 9f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') และ 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3') ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) (Yukphan และคณะ, 2005) โดยเริ่มจากใช้อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาอีก 30 รอบ (denaturation) ด้วยอุณหภูมิ 94 °C 1 นาที, primer annealing (55 °C 1-5 นาที), primer extension (32 °C 2-5 นาที) ในช่วงท้ายของกระบวนการจะเก็บที่ 72 °C 10 นาที และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ชิ้นส่วน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนจะถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี PCR product purification (HiGene™ Gel & PCR Purification System) และเพิ่มปริมาณโดย Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) (ดังรูปที่ 4.63)



M 1 2 3 4 5 6 7

รูปที่ 4.63 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 9F และ 1541R และแสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB40310 (1), ไอโซเลท MDB1228 (2), ไอโซเลท MDB1929 (3), ไอโซเลท MDB3222 (4), ไอโซเลท MDB822 (5), ไอโซเลท MDB2029 และ MDB30310 (7) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าความเข้มข้นของ DNA หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ววัดด้วยเครื่อง nano drop และแสดงตำแหน่งที่ทำการตัด (cut point)

ไอโซเลต	A260/280	ความเข้มข้น (ng/μl)	ตำแหน่งที่ตัด
MDB1929	1.84	158.4	R(728/42) F(970/40)
MDB30310	1.83	111.2	R(748/29) F(790/29)
MDB40310	1.83	236.8	R(728/42) F(919/29)
MDB3222	1.83	193.5	R(724/31) F(910/42)
MDB1228	1.85	131.6	R(728/41) F(927/39)
MDB822	1.81	54.9	R(769/27) F(961/34)
MDB2029	1.80	190.9	R(739/43) F(910/42)

และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST program และ Alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตรงกันด้วยสายพันธุ์ต้นแบบจาก EzBioCloud เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BioEdit Sequence Alignment Editor จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง Phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ข้อมูลที่คล้ายกันมากที่สุดจะถูกจับคู่และบันทึกความเป็นไปได้ในการจัดจำแนกแผนภูมิสายวิวัฒนาการถูกสร้างโดยใช้ neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) มีขั้นตอนการสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการใน Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7) software package version 6.06 (Tamura K *et al.*, 2013) ระยะวิวัฒนาการของ neighbour-joining และ maximum-likelihood trees อ้างอิงตาม Kimura's two-parameter method (Kimura M., 1980)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 7 ไอโซเลตเพื่อการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA gene จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยโปรแกรม EzBioCloud มีความคล้ายคลึงกับแอคติโนมัยซีทในสายพันธุ์ต่างๆ ดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.64-4.77

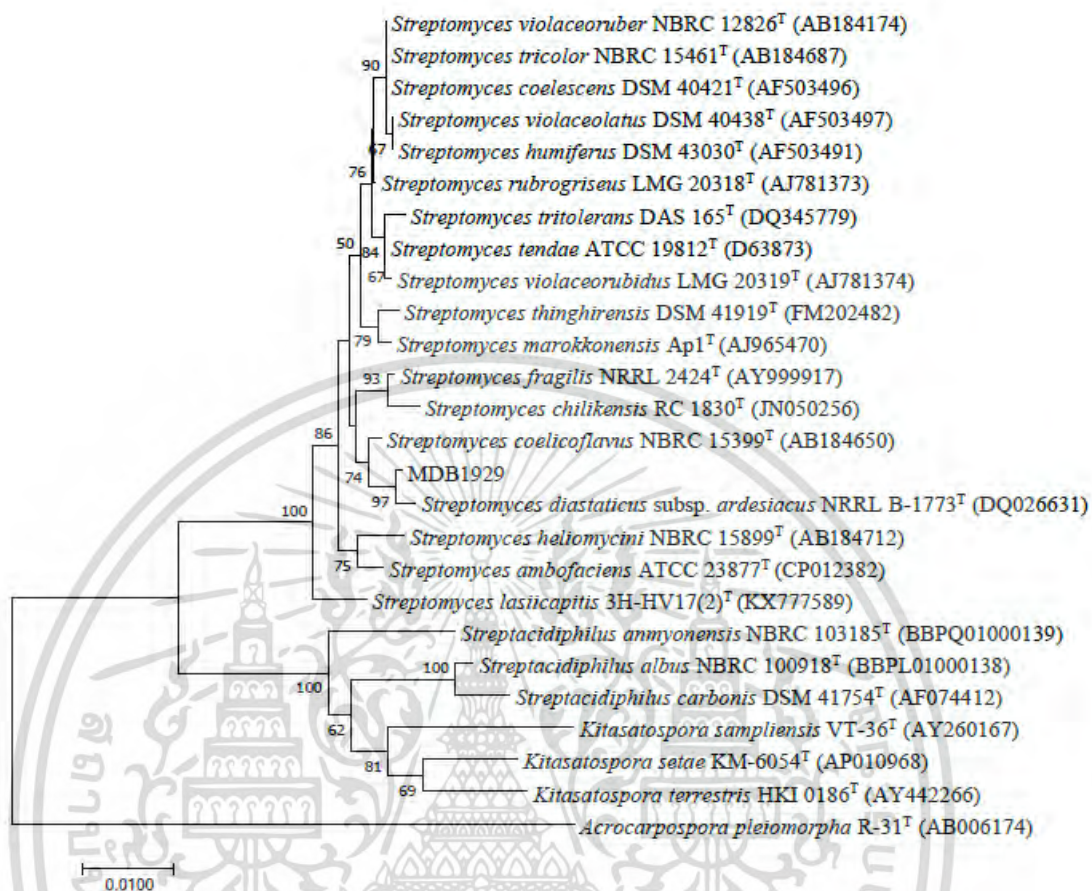
ตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ไอโซเลท	Sequence tested isolates	Identities (%) bp	GenBank accession No.
MDB1929	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i>	99.72	NRRL B-1773
MDB30310	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i>	99.69	NRRL B-1773
MDB40310	<i>Streptomyces luteus</i>	99.79	TRM 45540
MDB3222	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i>	99.71	NRRL B-1773
MDB1228	<i>Streptomyces rochei</i>	100.00	NRRL B-2410
MDB822	<i>Streptomyces rochei</i>	100.00	NRRL B-2410
MDB2029	<i>Streptomyces tendae</i>	99.86	ATCC 19812

TCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA
 GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCAAGGCATCT
 TGGCGGGTCAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTCAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCC
 GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCAGTCGAT
 ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTA
 CGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTTGGTGGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTTGCCAGCAACTCTTCGAGGTTG
 GGGACTCACGGGAGACCGCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCA
 CACGTGCTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGG
 TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACA
 CACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTTGGGAGGGAGCTGTGAAGGTGGGAC
 TGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAA

รูปที่ 4.64 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB1929

ขนาด 1,465 bp

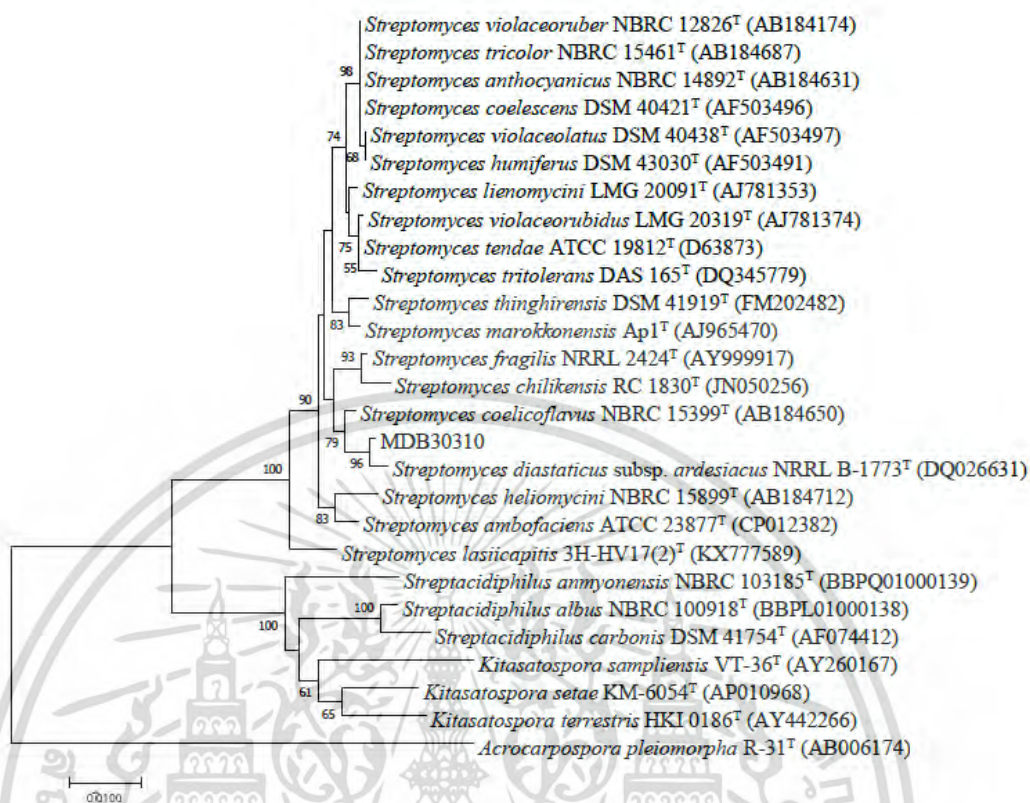


รูปที่ 4.65 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MDB1929

TGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACACCTTCGGGTGGGGATT
 AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGTCTAATACCGGATACTG
 ACCTGCCAAGGCATCTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGACGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGC
 TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATGACGACGACCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTC
 TTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGG
 GCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCTGATGGCGGCTTGTGCGCTCGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCC
 GGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
 AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGAGGAGCGAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCC
 CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTGGGTGTACAGGT
 GGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAA
 CTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGCCCTTA
 TGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGAC

รูปที่ 4.66 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MDB30310 ขนาด 1,299

bp
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



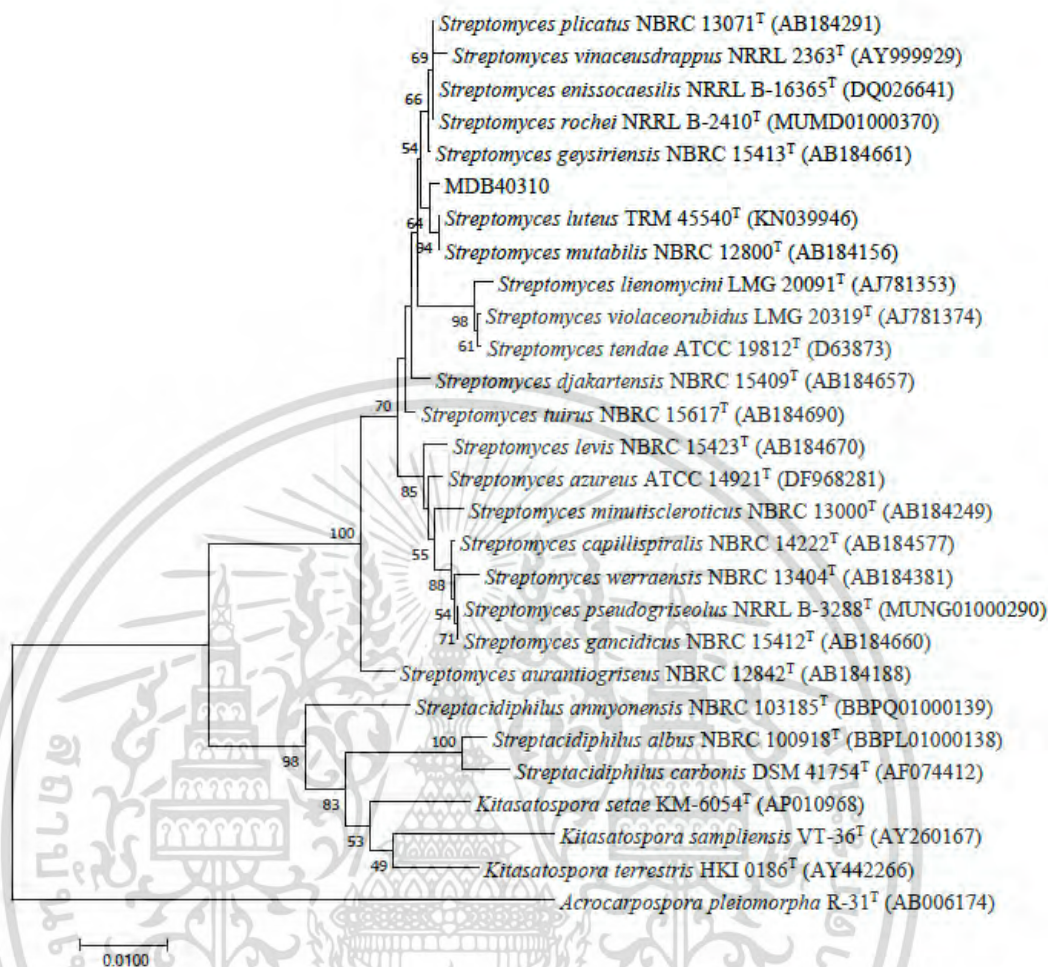
รูปที่ 4.67 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอสคิโนไมซีตาไอโซเลต MDB30310

CTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACACCTTCGGGTGGGATTAGTGCGGAACGGGTG
 AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCGGCATC
 TGGCAGGTTTCAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGCGGAATA
 TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTCAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCC
 GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTGCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGAT
 ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGTTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGAGTA
 CGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCAGCGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACCTTGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCT
 GGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTG
 CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGG
 GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTT

รูปที่ 4.68 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอสคิโนไมซีตาไอโซเลต MDB40310 ขนาด 1,414

bp

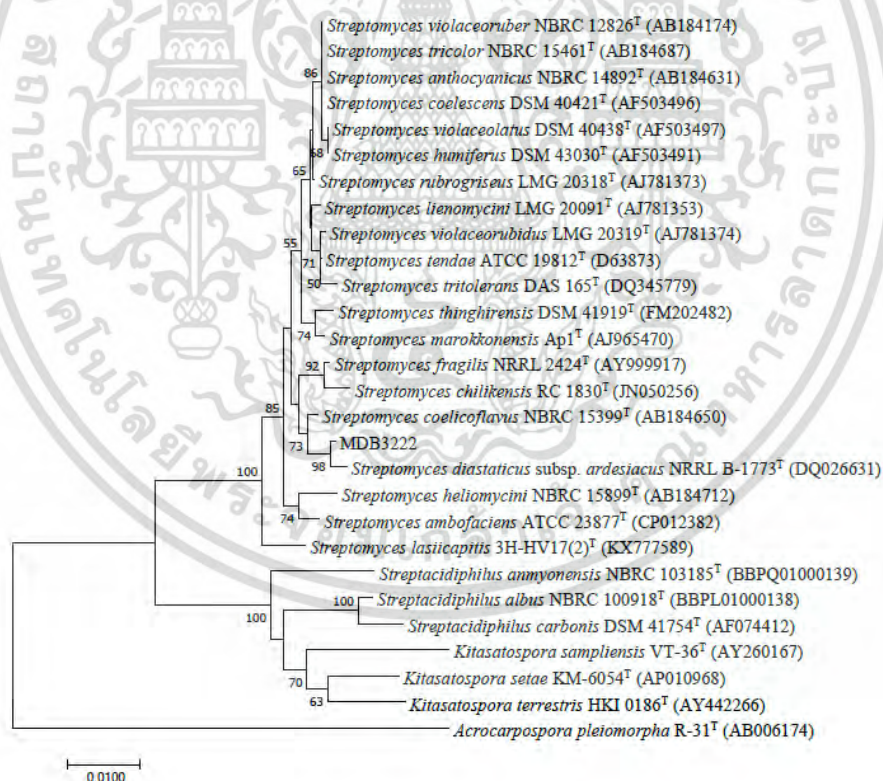
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.69 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB40310

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGCGGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCAAGGCATCTTG
GCGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACG
GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATA
CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGATAGCGGTAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCGTCGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTTGGTGGTGATAGGTGGTGCATGGCTGTGCG
TCAGCTCGTGTGATGAGTGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTCGTGTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGG
GGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAC
ACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGT
CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACAC
ACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCGGTGGCCC

รูปที่ 4.70 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีทีไอโซเลท MDB3222 ขนาด 1,402 bp

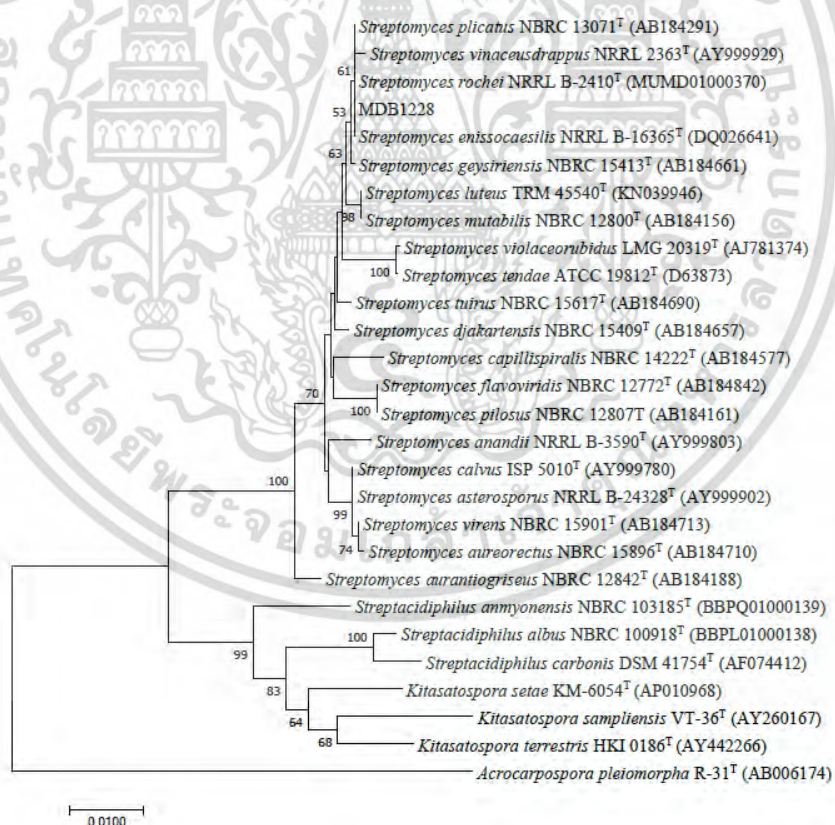


รูปที่ 4.71 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทีไอโซเลท MDB3222

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA
 GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCT
 GCGAGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACAGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTAGCAGGGAAGA
 AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCC
 GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTGCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGTCTGCAGTCGAT
 ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTA
 CGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACCTTGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCT
 GGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCTTGGGCTG
 CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG
 GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGG

รูปที่ 4.72 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB1228 ขนาด 1,422 bp



รูปที่ 4.73 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB1228

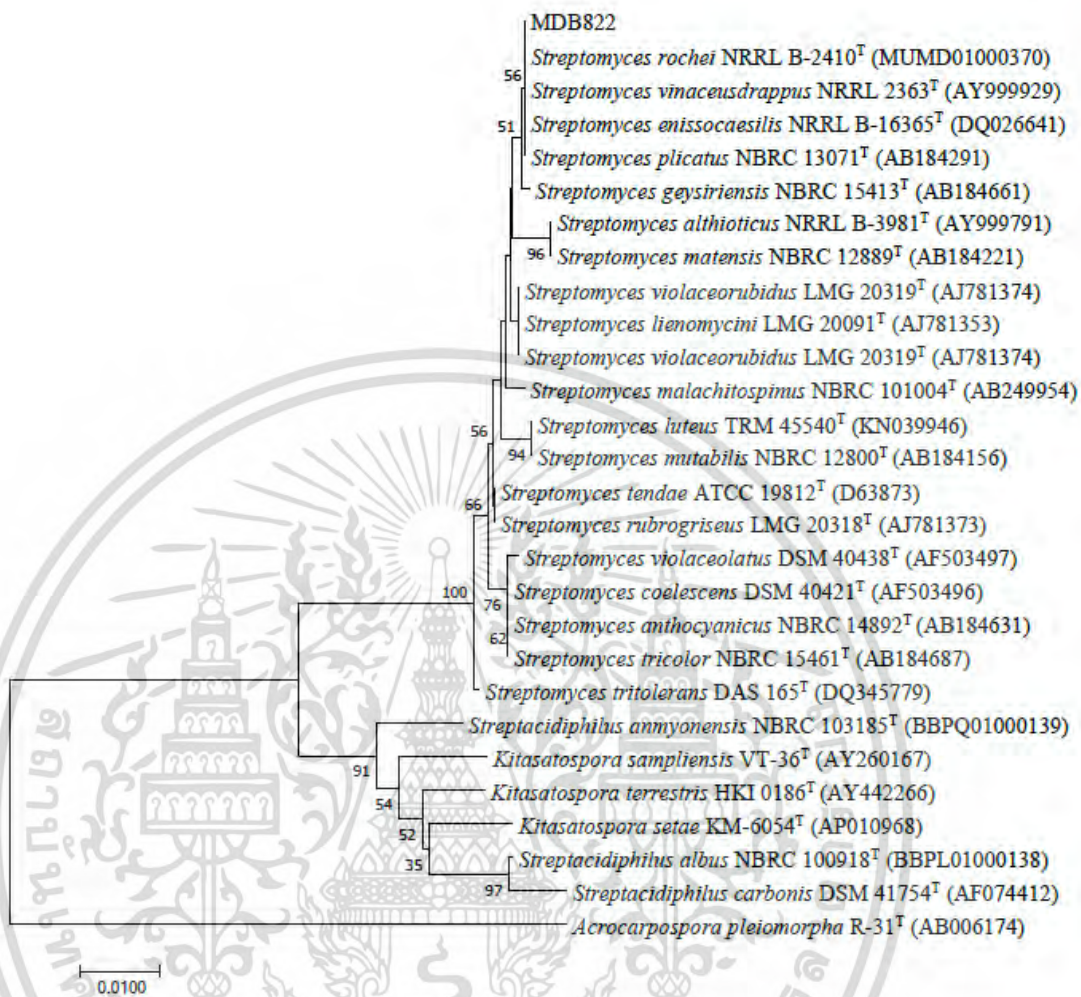
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAA
 CGATGAACCACCTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
 AACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTA
 TCAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGG
 TTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCG
 TGCCGCAGCTAACGATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAA
 GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGGAACCCCTGGAGACAGGGT
 CCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTGTCCCGTGTTCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
 ACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCATACCGCGAGGT
 GGAGCGAATCTCAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
 TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG
 GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGA

รูปที่ 4.74 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท MDB822

ขนาด 1,495 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



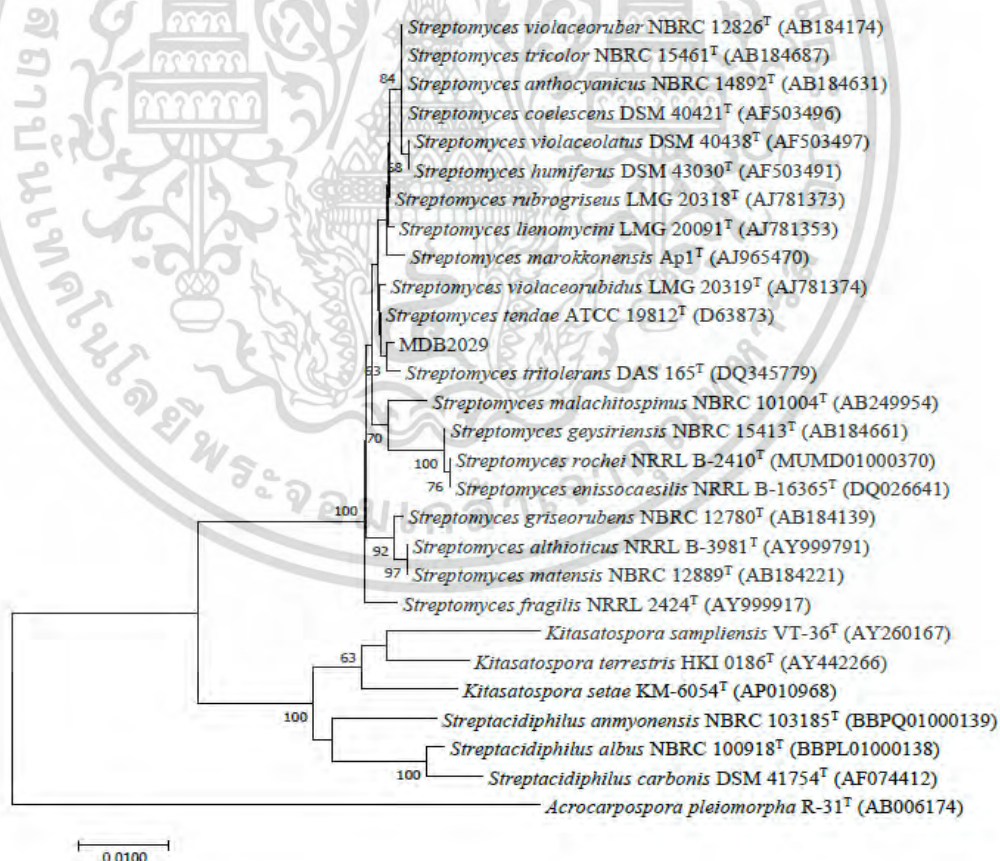
รูปที่ 4.75 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MDB822

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGC
 GAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCCTC
 GCAGGCATCTGCGAGGTTTCAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGCGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAAATGGCTCACCA
 AGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAG
 TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTTCAG
 CAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCA
 AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTTCGGTTGTAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCAGTCGATACGGGCGAGGTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
 CACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTCCCCCGCC
 TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGC
 AACCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCT
 TGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTC
 TTGGGCTGCACAGTGTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTT
 CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG

รูปที่ 4.76 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB2029 ขนาด 1,411

bp



รูปที่ 4.77 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีท์ไอโซเลท MDB2029

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวนทั้งหมด 41 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือใน 2 ฤดูกาล ครั้งละ 10 จุด สำหรับการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือครั้งที่ 1 ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 7.45 - 7.91 มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 10.47 และการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือครั้งที่ 2 ค่าความเป็นกรดต่าง ตั้งแต่ 8.21 - 8.41 มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 44.48 และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัย ซีทบน Starch casein agar พบว่า โดยเฉลี่ยสามารถเจริญและสร้างสปอร์ ได้ดีในระยะเวลา 5 - 10 วัน นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycerium) และ เส้นใยอากาศ (Aerial mycerium) ซึ่งสามารถนำมาจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Pink มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ MDB31310

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ MDB548, MDB11210, MDB3422, MDB3528, MDB148 และ MDB925

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ได้แก่ MDB2739 และ MDB2839

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีสมาชิกทั้งหมด 31 ไอโซเลท ได้แก่ MDB17310, MDB2029, MDB23310, MDB2433, MDB2639, MDB16310, MDB1829, MDB21210, MDB432, MDB732, MDB13310, MDB14310, MDB37310, MDB38310, MDB15310, MDB1929, MDB22310, MDB2539, MDB2939, MDB30310, MDB3222, MDB3322, MDB40310, MDB4123, MDB822, MDB39310, MDB632, MDB36310, MDB2510, MDB1025 และ MDB1228

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ MDB342

จากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถคัดแยกได้ 41 ไอโซเลท พบว่า การทดสอบการตกตะกอน (Cogulation) โปรตีนในหลอดอาหาร 10% Skim milk ร้อยละ 39 ให้ผลการทดลองเป็น weak คือ เกิดการตกตะกอนโปรตีนในหลอดอาหาร 10% Skim milk เล็กน้อย การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Casein hydrolysis) ในอาหาร Skim milk agar ร้อยละ 66 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Gelatin liquefaction) ในหลอดอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth ร้อยละ 59 ให้ผลการทดลองเป็นบวก คือ เกิดการย่อยสลายเจลาตินในหลอดอาหาร Bouillon Gelatin Broth การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reeduction) ในหลอดอาหารเหลว Peptone KNO₃ Broth ร้อยละ 69 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรทในหลอดอาหาร Peptone KNO₃ Broth และ การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) ในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) ร้อยละ 78 ให้ผลการทดลองเป็นลบ คือ ไม่เกิดการย่อยสลายแป้งในอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4)

สำหรับการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0.46, 3, 5 และ 7 มีเพียง 9 ไอโซเลทที่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือที่ร้อยละ 9 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ MDB 925 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดโดยมีขนาดเคลียร์โซนกว้างที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 22.14 มิลลิเมตร เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 พบว่าเมื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ (pH) เท่ากับ 8 ในอาหารเหลว ISP2 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 14 ไอโซเลทไม่พบการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase ด้วยอาหาร Modified M-9 ผสม phenol red ร้อยละ 0.009

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยวิธีการทดสอบขั้นต้น (pre-test) พบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลท ได้แก่ MDB148, MDB822, MDB13310, MDB39310, MDB16310, MDB17310, MDB342, MDB925 และ MDB1228

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยเทคนิค agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตต และ สารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 สายพันธุ์ เนื่องจากไม่พบการเกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าอาหาร

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 41 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 7 ไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานที่น่าสนใจ คือ ไอโซเลท MDB40310, ไอโซเลท MDB1228, ไอโซเลท MDB1929, ไอโซเลท MDB3222, ไอโซเลท MDB822, ไอโซเลท MDB2029 และ MDB30310 จึงทำการคัดเลือกเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทนี้ไปทำการศึกษาวเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) พบว่า MDB1929 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.72%, MDB30310 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.43%, MDB40310 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces luteus* 99.79%, MDB3222 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces diastaticus* subsp. *Ardesiacus* 99.71%, MDB1228 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* 100.00%, MDB822 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rochei* 100.00% และ MDB2029 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces tendae* 99.86% และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ได้ดังผลการทดลองที่ 4.8 รูปที่ 4.65-4.77

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี 2 แหล่ง ซึ่งเป็นแหล่งที่มีสภาวะความเข้มข้นของเกลือสูง พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนที่หลากหลาย จึงควรมีการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือในพื้นที่อื่นๆ และควรมีการเก็บตัวอย่างดินนาเกลือในแต่ละฤดูกาล เพื่อนำมาเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท ว่าแต่ละพื้นที่และฤดูกาลมีความหลากหลายทางชีวภาพเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรบ้าง

5.2.2 จากการศึกษาค้นคว้านี้ ทำให้สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท จึงควรมานำศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในการหาสกุล และสปีชีส์ เพื่อนำไปพัฒนาและวิจัยต่อยอดต่อไป

5.2.3 จากการศึกษาวิจัยนี้ ได้ทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ โดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและยีสต์เท่านั้น โดยอาจทำการทดสอบเพิ่มเติม เช่น การทดสอบกับเชื้อรา เพื่อให้การทดลองมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น หรืออาจทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์คือยา เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพที่มีประโยชน์ต่อการแพทย์และเภสัชกรรมต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

1. Khanungkan Klanbut, Chitti Thawai, Thitiya Rattanakevin, Duangduen Ploymukda, Nuntapop Pitijanyawong, Pranapda Numprapai. Cultivation in Starch Hydrolysis Medium of Actinomycetes from salt field and their Antimicrobial Activity. (*In preparation*)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย. 2555. “เกลือชุมทรัพย์แห่งแผ่นดิน” กองส่งเสริมแหล่งท่องเที่ยว
 คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย. 2558. การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลวและการทดสอบลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ. เอกสารประกอบวิชาปฏิบัติการสรีรวิทยาของจุลินทรีย์.
 กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จามจุรี เกตุบัวขาว, ณิชภา ชมพู และ สุพัตรา ชาวสวน. 2555. “การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์ เพื่อ
 ใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น.” ปรินญาณพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาวิชา
 ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- จิระพันธ์ กริ่งไกร. 2011. เอนไซม์. Cell Biology for Medical Students
- ดวงพร กันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรี
 นติ้ง เฮ้าส์.
- ทิพย์วรรณ เลื่อนศักดิ์, มณีรัตน์ วิเชียรรัตน์ และ รุจิโรจน์ ชยุติมา. 2558. “การศึกษาสภาวะต่างๆในการ
 เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทบนเกล็ดจากดินนาเกลือ ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร และ ตำบลบาง
 ปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา”. ปรินญาณพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบัน
 เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะ
 วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- ผาสุข เปี่ยมสุวรรณมาศ. 2548. “สารยับยั้งสปอร์ P. L. larvae จากแบคทีเรียและแนวโน้มนการประยุกต์ใช้
 ควบคุมโรคอเมริกันฟาล์วโรค”. วิทยานิพนธ์ปรินญาณวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
 เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2556. Casein [Online]. Available: <http://www.foodnetworksolution.com>
- ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หจก. วี. เจ. พรินติ้ง.
 รัตนารณ ศรีวิบูลย์. 2548. แอคติโนมัยซีท. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รพีภัทร์ อิงคสิทธิ์, ณัฐชานันท์ กล้าหาญ และ ณัฐกรณ์ อมรยางกูร. 2557. “จักรวาลสีขาว ดาวนาเกลือเม็ด”.
 38-43.
- โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ. 2551. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้าน จุลชีพ.
 หน้า 2-4 [Online]. Available : [http://www.hospital.tu.ac/LABWEBSITE](http://www.hospital.tu.ac/LABWEBSITE/Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf)
 /Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เลิศพงษ์ บุญชู. 2548. “การพัฒนาระบบวัดความไวของแบคทีเรียคือสารต้านจุลชีพโดยเทคนิค Disc Diffusion.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาอุปกรณ์การแพทย์ ภาควิชาฟิสิกส์ อุตสาหกรรมและอุปกรณ์การแพทย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- วสุ ปฐมอารีย์. ปฏิบัติการแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริรัตน์ ทองอุ่น. 2552. “การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์. 2013. “การทำนาเกลือ” [Online]. Available: <http://www.khogkham.rmutt.ac.th>
- สุภาพรรณ ม่วงพรหม. 2556. “เกลือสมุทร...ที่สมุทรสาคร” หน่วยงาน อุทยานการเรียนรู้สมุทรสาคร สังกัด อบจ.สมุทรสาคร
- สุรัชย์ รัตนสุข. 2557. “ประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans*”. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สทวท.). 1(2): 33-40.
- สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. วิทยาแบคทีเรีย. สุรินทร์ : สถาบันราชภัฏสุรินทร์.
- อัมพร โขยา. 2556. “วิถีปัญญาวิถีแห่งสุขบางขุนไทร”. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการส่งเสริม สุขภาพ : 17
- Alvarez-Elcoro, S. and Enzler, M.J. 1999. “The Macrolides: Erythromycin, Clarithromycin, and Azithromycin.” *Mayo Clinic Proceedings*. 74(6): 613-634.
- Asagbra, A.E. Sanni, A.I. and Oyewole, O.B. 2005. “Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 107-114.
- Ashwathi, P. 2008. **Microorganisms Found in Soil**. [Online]. Available : <http://www.biologydiscussion.com/soil/7-microorganisms-found-in-soil-microbiology/66603>. 21(2): 107-114.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Order Actinomycetales, pp. 657-861. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Neiven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 th ed. Wilkins, Baltimore.
- Champney, W.S. and Burdine, R. 1995. “50S Ribosomal Subunit Synthesis and Translation Are Equivalent Targets for Erythromycin Inhibition in *Staphylococcus aureus*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4(5): 1301-1303.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dastager, S.G. Li, W.J. Dayanand, A. Tang, S.K. Tian, X.P. Zhi, X.Y. Xu, L.H. and Jiang, C.L. 2006.

“Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*.” *African Journal of Biotechnology*. 5(8) : 1131-1134.

Dhanasekaran, D. Rajakumar, G. Sivamani, P. Selvamani, S. Panneerselvam, A. and Thajuddin, N. 2004.

“Screening of Salt Pans Actinomycetes for Antibacterial Agents.” *The Internet Journal of Microbiology*. 2(1): 1-4.

Doroghazi, J.R. and Metcalf, W.W. 2013. “Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes.” *BMC Genomics*. 11(14): 611.

Dunca, S. Tănase, C. Ștefan, M. and cojocariu. 2016. “Characterization of the microbiota from different types of anthropogenic soils.” *European Scientific Journal*. 14(3): 237-251.

Fitri, L. and Bustam, M. Betty 2010. “Screening of antimicrobial producing strains isolated from the soil of grassland rhizosphere in Pocut Meurah Intan Forest Park, Seulawah, Aceh Besar.” *Biodiversitas*. 11: 129-132.

Googfellow, M., Williams, S. T. and Mordarski, M. 1988. **Actinomycetes in biotechnology**. Academic Press Limited. London.

Jose, P.A. Robinson, S. and Jebakumar, D. 2013. “Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India.” *Frontiers in Microbiology*. 13(4): 1-9.

Klanbut, K. 2013. “The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*.” A thesis for the degree of Doctor of philosophy. University of Strathclyde, UK.

Khanungkan Klanbut, Siranan Klanbut, Charanyarut Sukphattanaudomchoke, Natticha Namboon and Sorawit Buraphawat, (2017) Phospholipids and antimicrobial activity of actinomycetes from mangrove forest soils in Eastern part of Thailand. Proceeding in The 29th Annual meeting of the Thai society for Biotechnology and International conference November 23-25, 2017 Swissotel Le Concorde, Bangkok Thailand. EB-191: 1-11.

Kushner, D.J. 1978. **Microbial life in extreme environments**. London : Academic press.

Leboffe, MJ., Pierce, B.E. 2011. “A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory.” GELATINASE TEST. 102.

Li, Q. Chen, X. Jiang, Y. and Jiang, C. 2016. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**: INTECH Open Access Publisher.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Manteca, A. Fernandez, M. and Sanchez, J. 2005. "Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves." *BioMed Central Microbiology*. 5(11) : 1-11.
- Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes**. Tokyo: Asakura Publisher.
- Mundie, D.A. 1995. **The NBS/ISCC Color System**. Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc-20. [Online]. Available: <http://www.tx4.us/nbs-iscc.htm>.
- Nair, D.N. and Padmavathy, S. 2014. "Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans." *The Scientific World Journal*. 22(1) : 1-12.
- Nakajima Y, Kitpreechavanich V, Suzuki K, Kudo T. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*1999; 49:1761 –1767.
- Neu, H.C. and Gootz, T.D. 1996. "Antimicrobial Chemotherapy." *Medical Microbiology*. 11(4): 21-41.
- Phongsopitanun, W., Suwanborirux, K. and Tanasupawat, S. 2014. "Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment." *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38(1): 1-56.
- Procópio, R.E.L. Silva, I.R. Martins, M.K. Azevedo, J.L. and Araújo, J.M. 2012. "Antibiotics produced by *Streptomyces*." *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(5): 466-471.
- Raja, A. and Prabakaran, P. 2011. "Actinomycetes and Drug-An Overview." *American Journal of Drug Discovery and Development*. 10(1): 75-84.
- Rajan, L.A. Joseph, T.C. Thampuran, N. and James, R. (2010). "Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions." *Microbiology Research*. 2(4) : 22-25.
- Sadeghi-Nejad, B. and Azish, M. 2013. "In vitro antibacterial and antifungal effect of some medicinal plants." *African Journal of Microbiology Research*. 7(29): 3802-3806.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol.Biol.Evol.* 4, 406–425.
- Saurav, K. and Kannabiran, K. 2010. "Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces* VITSVK9 spp. isolated from Bay of Bengal, India." *Journal of Natural & Environmental Sciences*. 1(2): 56-65.
- Shaik, M. Sankar, G.G. Iswarya, M. Rajitha, P. 2017. "Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10." : 1-8.
- Sharma, C., Agarwal, A., Mehtani, P., Mathur, N. and Bhatnagar, P. 2014. "Characterization of

- Actinomycetes from Soil Sample of Nahargarh Hill Area, Jaipur, India for Production of Antimicrobial Compounds and Enzymes.” *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 15(3): 304-312.
- Sood, S. 2016. “Chloramphenicol – A Potent Armament Against Multi-Drug Resistant (MDR) Gram Negative Bacilli.” *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(2): 1-3.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). “Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method”. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101, 11030–11035.
- Teja, D.D. Devi, V.S. Harsha, N. Vishala, S.S. and Lakshmi, P.K.S. 2014. “Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes.” *International Journal of Advanced Research*. 2(1): 485-491.
- Todar, K. 2008. **Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease**. [Online]. Available: http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial_4.html.
- Toru Hasegawa, Masayuki Takizawa, Andseiichi Tanida. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol* 1983; 29:319–322.
- Ventosa, A. Nieto, J.J. and Oren, A. 1998. “Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria.” *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(2): 504–544.
- Wadetwar, R.N. and Patil, A.T. 2013. “Isolation and characterization of bioactive actinomycetes form soil in around Nagpur.” *International Journal Phamaceutical Sciences and Research*. 4(4) : 1428-1433.
- Wierman, C.K. and Hutchinson, C.R. 1985. “Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*.” *Journal of Bacteriology*. 164(1): 425-433.
- Wildermuth, H. 1970. “Development and Organization of the Aerial Mycelium in *Streptomyces coelicolor*.” *J. gen. Microbiol*. 60(1): 43-50
- Zumla, A. Nahid, P. and Cole, S.T. 2013. “History of tuberculosis drug development.” *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(3) : 308-404.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Starch casein agar

ส่วนประกอบ

Soluble starch	10	กรัม	เตรียมเป็นสารละลาย
KNO ₃	2	กรัม	
NaCl	2	กรัม	
Casein	2	กรัม	
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	กรัม	
CaCO ₃	0.02	กรัม	
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม	
Agar	15	กรัม	
น้ำกลั่น	1	ลิตร	
pH 7.0-7.2			

ละลาย KNO₃, NaCl, Casein, MgSO₄•7H₂O, CaCO₃ และ FeSO₄•7H₂O ให้เข้ากันก่อน จากนั้นจึงเติมสารที่เหลือ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Manitol salt agar (MS agar หรือ SFM agar)

ส่วนประกอบ

Soyabean flour	20	กรัม
Manitol	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.0-7.2		

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที

Yeast extract malt extract agar (ISP-2)ส่วนประกอบ

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Hickey tresner agarส่วนประกอบ

Soluble starch	2	กรัม
Peptone	0.4	กรัม
Beef extract	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Skim milk agarส่วนประกอบ

Skim milk powder	28	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH (25 °C) 7.0 ± 0.2

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 115°C เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mueller-Hinton agarส่วนประกอบ

Beef infusion solids	2	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH (25 °C) 7.3 ± 0.2

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Nutrient agarส่วนประกอบ

Peptic digestion of animal tissue	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH (25 °C) 6.8 ± 0.2

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

Bouillon Gelatin Brothส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Malt extract	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.2

* ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone KNO₃ brothส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.2

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

Inorganic salts – starch agar, ISP medium no.4ส่วนประกอบ

Soluble starch	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	กรัม
CaCO ₃	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิตร
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.4

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

Trace salts solutionส่วนประกอบ

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptonization and Coagulation test medium

ส่วนประกอบ

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein enzymeic hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0-7.2

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

Mueller-Hinton agar

ส่วนประกอบ

Beef infusion solids	2.0	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2 (25°C)

*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

Sabouraud's dextrose agar

ส่วนประกอบ

Mycological peptone	10.0	กรัม
Dextrose	40.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 5.6 ± 0.2 (25°C)

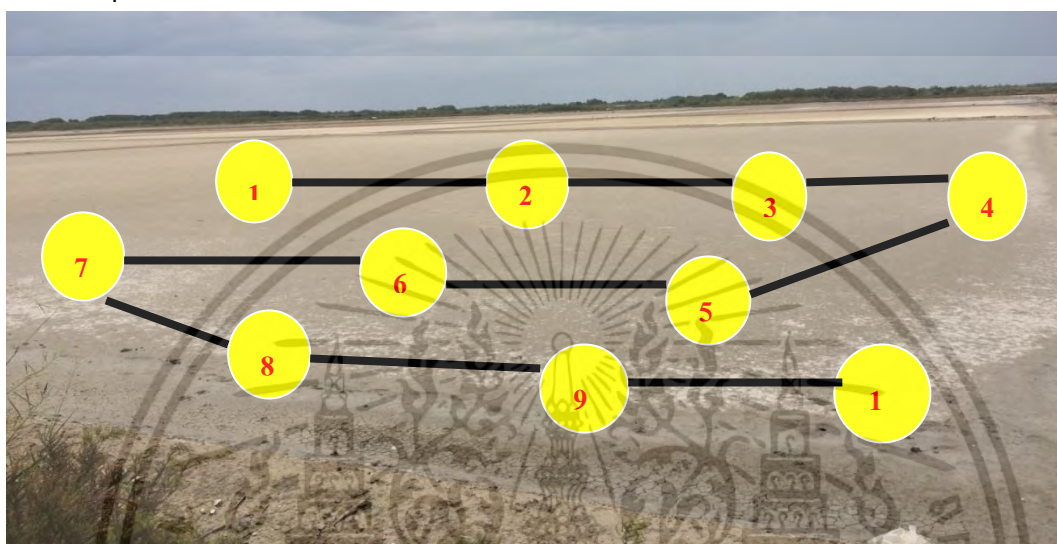
*ทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธี Autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

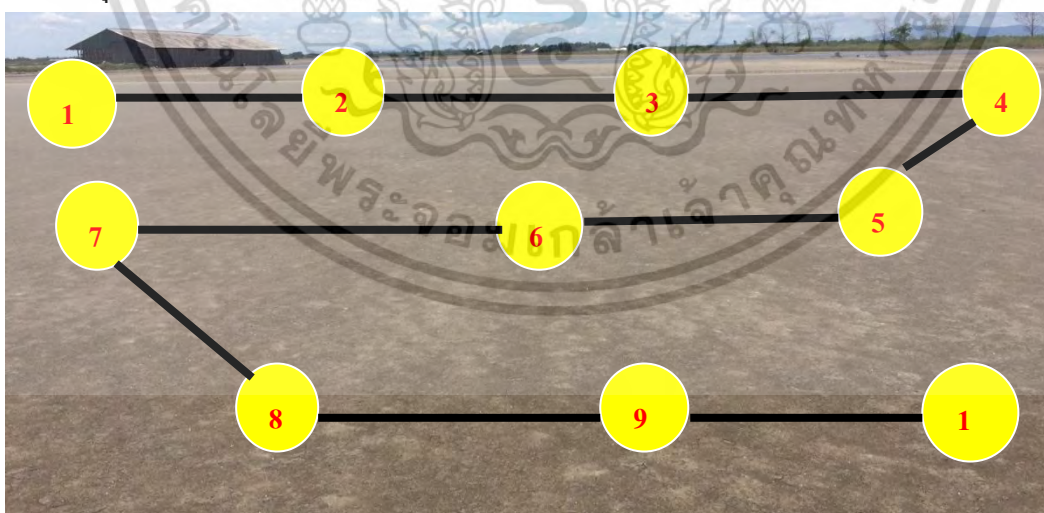
ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน ในเดือนตุลาคม และธันวาคม 2559 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี



รูปที่ ก แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 (ดิน A) จากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

จุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) ในเดือนมกราคม และมีนาคม 2560 เป็นตัวอย่างดินจากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี



รูปที่ ข แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 (ดิน B) จากนาเกลือ ตำบลบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน A ตำแหน่งที่ 1-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๙ แสดงจุดเก็บตัวอย่างดิน B ตำแหน่งที่ 1-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

(โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2555)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่าได้กับจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (ซึ่งเทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 โดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร)

ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1% v/v Conc. H_2SO_4	99.50	มิลลิลิตร
1.175% v/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.50	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร และสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 ที่ได้มาบรรจุใส่หลอดฝาเกลียว ปิดสนิทกันการระเหย แล้วนำไปเก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส
4. ก่อนใช้งานต้องเขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งตรวจสอบความขุ่นทุกเดือนโดยสารดังกล่าวนี้มีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

ตำแหน่งปัจจุบัน -

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
PhD in Pharmacy and Biomedical Science	Molecular Microbiology	University of Strathclyde, UK	2557
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2547
วิทยาศาสตรบัณฑิต	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2544

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) การคัดแยกแอกติโนมัยซีทและยีนที่ควบคุมการสร้างฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2550	ทุนศึกษาต่อระดับปริญญาเอก ณ University of Strathclyde, UK	กระทรวงวิทยาศาสตร์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

งานวิจัย

1) Panuwan Chantawannakul, Anchalee Oncharoen, Khanungkan Klanbut, Ekachai Chukeatirote and Saisamorn Lumyong, (2002) Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermophilic blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The Japanese Journal of Phycology* 52 (supplement): 57-60.
- 3) คณิงกานต์ กลั่นบุศย์, ยูวดี พีรพรพิศาล, ชาตชัย โชนงนุช และ Masaharu Ishii. 2547. การศึกษาเอนไซม์ไฟเตสที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำพุร้อนบางแห่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T)* ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ 1: 237-244.
- 4) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermotolerant blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology" and JSPS-NRCT Symposium "The Forefront of Bioinformatics Application"*: I-7.
- 5) Vinod Jyothikumar, Khanungkan Klanbut, John Tiong, James S. Roxburgh, Iain S. Hunter, Terry K. Smith and Paul R. Herron, (2012) Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology* 84 (1): 181-197.
- 6) Chitti Thawai, Nattawut Rungjindamai, Khanungkan Klanbut, Somboon Tanasupawat, (2017) *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. pp.
- 7) Khanungkan Klanbut, Jakturong Owat, Naris Kueakulpattana and Peerapol Tonghan, (2015) Antimicrobial activity and phospholipids of actinomycetes isolated from mangrove forest soil samples of Klongtamrhu Chonburi Thailand. The 13th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program on November 6-8th, 2015 in Shen Zhen, China: 57. (เป็นผู้ทำงานวิจัย)
- 8) Khanungkan Klanbut, (2016) Protease from Actinomycetes isolated from mangrove forest soil and salt field soil samples in Thailand with their culture characterization and antimicrobial activity. The 14th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program on November 6-9th, 2016 in Saint Petersburg, Pushkin, Russian Federation
- 9) Khanungkan Klanbut, Siranan Klanbut, Charanyarut Sukphattanaudomchoke, Natticha Namboon and Sorawit Buraphawat, (2017) Phospholipids and antimicrobial activity of actinomycetes from mangrove forest soils in Eastern part of Thailand. Proceeding in The 29th Annual meeting of the Thai society for Biotechnology and International conference 23-25 November 2017.

ทุนวิจัยที่เคยได้รับ

1. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย การศึกษา Phospholipids ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้จากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี

The role of phospholipids in Actinomycetes bacteria from mangrove forest in Chonburi province.

แหล่งทุน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล้ว้งแล้วประมาณร้อยละ 100

2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย เอนไซม์โปรติเอสจากแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรีและคุณสมบัติบางประการในการเพาะเลี้ยงและการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

Protease form Actinomycetes isolated from mangrove forest soil from Chonburi province with their culture characterization and antimicrobial activity

แหล่งทุน คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล้ว้งแล้วประมาณร้อยละ 100

การเสนอผลงานวิชาการ

1. การนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง Antimicrobial activity and phospholipids of actinomycetes isolated from mangrove forest soil samples of Klongtamrhu Chonburi Thailand ในงานประชุมวิชาการ The 13th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program วันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2558 ณ เมือง Shen Zhen ประเทศจีน
2. การนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง Protease from Actinomycetes isolated from mangrove forest soil and salt field soil samples in Thailand with their culture characterization and antimicrobial activity ในงานประชุมวิชาการ The 14th International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program วันที่ 6-9 ณ เมือง Saint-Petersberg ประเทศรัสเซีย
3. การนำเสนอแบบ Oral presentation เรื่อง Phospholipids and antimicrobial activity of actinomycetes from mangrove forest soils in Eastern part of Thailand. ในงานประชุมวิชาการ The 29th Annual meeting of the Thai society for Biotechnology and International conference วันที่ 23-25 พฤศจิกายน 2560 กทม. ประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้