

การจำแนกโดย 16s rRNA gene และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของ
เชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน และดินธารน้ำพุร้อน
CLASSIFICATION BY 16s rRNA GENE ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM A MANGROVE
FOREST AND HOT SPRING SOIL



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและตีพิมพ์ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ปีการศึกษา 2561

CLASSIFICATION BY 16s rRNA GENE ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM A MANGROVE
FOREST AND HOT SPRING SOIL



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2018
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การจำแนกโดย 16s rRNA gene และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน และดินธารน้ำพุร้อน
Classification by 16s rRNA gene antimicrobial activity of Actinomycetes from a mangrove forest and hot spring soil

ชื่อนักศึกษา

นางสาว ณีฐมล . ช่วยชู รหัสนักศึกษา 58050753
นางสาว ธนาภา ฤชุทัศน์สกุล รหัสนักศึกษา 58050765
นางสาวศุภาพิชญ์ พ่วงเพ็อง รหัสนักศึกษา 58050822

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

คณะ

วิทยาศาสตร์

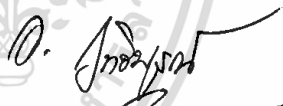

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ กรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เอไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การจำแนกโดย 16s rRNA gene และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลน และดินธารน้ำพุร้อน		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ณัฐมล ช่วยชู	รหัสนักศึกษา	58050753
	นางสาว ธนาภา ฤชุทัศน์สกุล	รหัสนักศึกษา	58050765
	นางสาวศุภาพิชญ์ พวงเฟื่อง	รหัสนักศึกษา	58050822
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์		

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ซึ่งได้เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 15 ไอโซเลทและจากบริเวณธารน้ำพุร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งได้เชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท (ภัทรารักษ์ และคณะ, 2559) จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ ทำการคัดเลือกโดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีการ Preliminary test เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 6 ไอโซเลท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท 6 ไอโซเลท ในอาหาร Yeast-extract Malt-extract (YEME) นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion จากนั้นทำการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทโดยการใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการโดยคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 7 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท BK530 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sundarbansensis* 99.79% ไอโซเลท BK830 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseorubens* 99.72% ไอโซเลท SM1322211 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseoincarnatus* 98.64% ไอโซเลท SM0212103 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces coerulescens* 97.38% ไอโซเลท SM1712113 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces rochei* 100% ไอโซเลท SM14122110 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces hyderabadensis* 99.38% และไอโซเลท BK1030 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Streptomyces griseoruber* 96.68% ซึ่งไอโซเลท SM1322211, SM0212103 และ BK1030 มีแนวโน้มว่าจะเป็นแอสโคดีโนมัยสปีชีส์ใหม่

คำสำคัญ : แอสโคดีโนมัยสปีชีส์, ป่าชายเลน, ดินธารน้ำพุร้อน, ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ, 16s rRNA gene



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Classification by 16s rRNA gene antimicrobial activity of Actinomycetes from a mangrove forest and hot spring soil	
Student	Miss. Nutthamon Chaychoo	student ID 58050753
	Miss. Thanapa Luchutassakul	student ID 58050765
	Miss. Suphaphit Phuangfueang	student ID 58050822
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut' Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2018	
Advisor	Dr. Kranungkan Klunbut	

Abstract

Fifteen isolates of actinomycetes from the mangrove forest Samet, Mueang, Chonburi and 24 isolates from Suan Phueng hot spring, Ratchaburi were isolated. Morphology and biochemical tests were examined. Antimicrobial activity against 6 tested microorganisms; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231 found 6 isolates which have inhibition zone on ISP2 agar by Preliminary test technique. Agar disc diffusion were performed on Yeast-extract Malt-extract broth (YEME). 16s rRNA gene of 7 isolates were sequenced and could be classified to; BK530 has 99.79% similarity to *Streptomyces sundarbansensis*, BK830 has 99.72% similarity to *Streptomyces griseorubens*, SM1322211 has 98.64% similarity to *Streptomyces griseoincarnatus*, SM0212103 has 97.38% similarity to *Streptomyces coerulescens*, SM1712113 has 100% similarity to *Streptomyces rochei*, SM14122110 has 99.38% similarity to *Streptomyces hyderabadensis* and BK1030 has 96.68% similarity to *Streptomyces griseoruber* which isolates SM1322211, SM0212103 and BK1030 trend to be new species.

Keywords : Actinomycetes, Mangrove forest, hot spring soil, Antimicrobial activity, 16s rRNA gene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ซึ่งท่านได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ และให้ความช่วยเหลือที่ดีในทุกๆด้าน ตลอดจนชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้จัดทำตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบุรณ และ รศ.ดร.จิตติ ท่าวัว ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการ อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำ ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์จนประสบผลสำเร็จ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ฟีจิตติยา รัตนะเควิล และเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ที่ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือ จนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่คอยสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้จัดทำ อีกทั้งยังให้ความเข้าใจและเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้จัดทำเสมอมา จนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวณัฐมล
นางสาวธนาภา
นางสาวศุภาพิชญ์

ช่วยชู
ฤชต์ศนสกุล
พวงเพ็อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท.....	4
2.2 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท.....	4
2.2.1 <i>Micrococcus, Microbacterium</i> และสกุลที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.2.2 <i>Mycobacterium, Nocardia</i> และสกุลที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.2.3 Family <i>Pseudonocardiaceae</i> และสกุลที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.2.4 Family <i>Micromonosporaceae</i>	5
2.2.5 Family <i>Thermomonosporaceae</i>	5
2.2.6 Family <i>Streptosporangiaceae</i>	5
2.2.7 Family <i>Streptomycetaceae</i>	5
2.2.8 สกุลอื่นๆ.....	5
2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	5
2.3.1 เส้นใย.....	6
2.3.2 โคนิเดีย.....	6
2.3.3 อับสปอร์.....	6
2.3.4 โครงสร้างอื่นๆ.....	6
2.4 การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยสีท.....	6
2.4.1 ลักษณะของโคโลนี.....	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 โครงสร้างภายในของโคโลนี.....	7
2.5 การสร้างสปอร์.....	8
2.5.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว.....	8
2.5.2 การสร้างสปอร์ที่เป็นสาย.....	8
2.5.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์.....	10
2.6 วัฏจักรของแอคติโนมัยสีท.....	11
2.7 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีท.....	12
2.7.1 การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ.....	12
2.7.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม.....	12
2.7.3 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืช นำไปใช้ได้.....	12
2.7.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ.....	13
2.7.5 ความสามารถในการนำไปควบคุมโรคพืช.....	13
2.8 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ.....	13
2.8.1 แหล่งธาตุอาหารคาร์บอน.....	13
2.8.2 แหล่งธาตุไนโตรเจน.....	13
2.8.3 อนินทรีย์ฟอสเฟต.....	13
2.8.4 โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย.....	14
2.9 ป่าชายเลน.....	14
2.9.1 ลักษณะดินป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี.....	14
2.9.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากดินป่าชายเลน.....	15
2.10 น้ำพุร้อน.....	16
2.10.1 ธารน้ำร้อนบ่อคลึง.....	16
2.10.1.1 ที่ตั้ง.....	16
2.10.1.2 ลักษณะธรณีวิทยา.....	16
2.10.1.3 ลักษณะทางกายภาพ.....	17
2.10.1.4 ลักษณะทางเคมี.....	17
2.11 การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทโดยการใช้ 16s rRNA gene และการจัด ลำดับสายวิวัฒนาการ.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเขียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11.1 Ribosomal RNA และการใช้ 16s rRNA gene.....	18
2.11.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	18
2.11.3 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 เครื่องมือ.....	21
3.2 อุปกรณ์.....	21
3.3 สารเคมี.....	22
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	24
3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	24
3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน.....	24
3.6.2 การเพาะเลี้ยง การแยก และการเก็บรักษาเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	25
3.6.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน.....	25
3.6.3.1 การหาน้ำหนักดิน.....	25
3.6.3.2 การหาปริมาณความชื้น.....	25
3.6.3.3 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	26
3.6.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา.....	26
3.6.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ.....	26
3.6.6 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ.....	26
3.6.6.1 การย่อยสลายโปรตีนในนม Peptonization.....	26
3.6.6.2 การย่อยสลายเจลาติน.....	26
3.6.6.3 การย่อยสลายแป้ง.....	27
3.6.6.4 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 5 ชนิด.....	27
3.6.6.5 Oxidase test.....	27
3.6.6.6 Catalase test.....	27
3.6.7 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น.....	28
3.6.8 การทดสอบกิจกรรมด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดย ใช้เทคนิค Agar disc diffusion.....	28
3.6.8.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นชอบใช้ประโยชน์ด้านการการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.8.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของเชื้อ แอสคิตินอมัยสีท.....	28
3.6.8.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	29
3.6.8.4 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ.....	29
3.6.8.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion.....	29
3.6.9 การจัดจำแนกแอสคิตินอมัยสีทโดยการใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ.....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	31
4.1 การคัดแยกเชื้อแอสคิตินอมัยสีท.....	31
4.2 สมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน.....	32
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอมัยสีท.....	32
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมัยสีท.....	32
4.3.2 ลักษณะทางโคโลนีของแอสคิตินอมัยสีทที่คัดแยกได้ จำนวน 15 ไอโซเลท จากดินป่าชายเลน.....	50
4.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิตินอมัยสีทที่พบจากการ เก็บตัวอย่างจากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง.....	51
4.3.4 ลักษณะทางโคโลนีของแอสคิตินอมัยสีทที่คัดแยกได้ จำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง.....	65
4.3.5 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอมัยสีท.....	66
4.3.6 การศึกษาเชื้อแอสคิตินอมัยสีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล.....	68
4.4 การคัดเลือกเชื้อแอสคิตินอมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น....	69
4.5 การทดสอบกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion.....	75
4.6 การตรวจสอบลักษณะทางจีโนมไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ.....	76
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	86
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	86
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88

เอกสารอ้างอิง..... 89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	96
ภาคผนวก ก.....	97
ภาคผนวก ข.....	101
ภาคผนวก ค.....	104
ภาคผนวก ง.....	105
ภาคผนวก จ.....	106
ภาคผนวก ฉ.....	107
ภาคผนวก ช.....	108
ภาคผนวก ซ.....	110
ประวัติผู้วิจัย.....	125



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ของ universal primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่มีความเกี่ยวข้องกับ 16s rRNA gene.....	19
4.1 หมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่าง.....	31
4.2 สมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน.....	32
4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 15 ไอโซเลท เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system).....	48
4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลึง.....	63
4.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 15 ไอโซเลท.....	66
4.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลึง.....	67
4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยใช้น้ำตาลทดสอบ 5 ชนิด.....	68
4.8 ผลการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากป่าชายเลน.....	71
4.9 ผลการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากธารน้ำพุร้อนบ่อคลึง.....	72
4.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อ แอกติโนมัยสีท.....	77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะโคโลนีของแอสคิโนมัยซีท.....	4
2.2 การสร้างโคโลนีของแอสคิโนมัยซีทบนอาหารแข็ง.....	7
2.3 การสร้างสปอร์เดี่ยว.....	8
2.4 ลักษณะสปอร์ที่เป็นสาย.....	8
2.5 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	9
2.6 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร.....	10
2.7 รูปทรงของอับสปอร์.....	11
2.8 วัฏจักรชีวิตของแอสคิโนมัยซีท.....	12
2.9 ป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน.....	15
2.10 ธารน้ำร้อนบ่อคลึง.....	17
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 0311102.....	33
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 0212103.....	34
4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1622107.....	35
4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1512115.....	36
4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1922104.....	37
4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1922206.....	38
4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1712108.....	39
4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1912109.....	40
4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1912114.....	41
4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1412112.....	42
4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 0711201.....	43
4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1412105.....	44
4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1422110.....	45
4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1322211.....	46
4.15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท SM 1712113.....	47
4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท BK 120.....	51
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท BK 122.....	51
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท BK 220.....	52
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท BK 520.....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปรูปภาพ (ต่อ)

รูปรูปภาพที่	หน้า
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 522.....	53
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 530.....	53
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 730.....	54
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 820.....	54
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 821.....	55
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1020.....	55
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1030.....	56
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1232.....	56
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 121.....	57
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 132.....	57
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 230.....	58
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 830.....	58
4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 831.....	59
4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1021.....	59
4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1630.....	60
4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 123.....	60
4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 232.....	61
4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 235.....	61
4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 521.....	62
4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1520.....	62
4.40 แสดงลักษณะการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยสีทในการผลิตสาร ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพต่อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด.....	74
4.41 แสดงภาพ Gel electrophoresis.....	76
4.42 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK530 ขนาด 1,537 bp.....	77
4.43 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK530.....	78
4.44 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK830 ขนาด 1,468 bp.....	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพที่	หน้า
4.45 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK830.....	79
4.46 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1322211 ขนาด 1,427 bp.....	79
4.47 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1322211.....	80
4.48 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM0212103 ขนาด 1,137 bp.....	80
4.49 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM0212103.....	81
4.50 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1712113 ขนาด 849 bp.....	81
4.51 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1712113.....	82
4.52 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1422110 ขนาด 709 bp.....	82
4.53 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1422110.....	83
4.54 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK1030 ขนาด 737 bp.....	83
4.55 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK1030.....	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยาต้านจุลชีพมีทั้งยาต้านแบคทีเรีย ยาต้านไวรัส ยาต้านรา และยาต้านปรสิต ยาต้านจุลชีพมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากยากลุ่มอื่นอย่างน้อย 2 ประการ ได้แก่ ยาต้านจุลชีพยับยั้งและทำลายเชื้อโรค โดยมีผลต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ของมนุษย์น้อยมาก ขณะที่ยากลุ่มอื่นมักมีผลต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ของมนุษย์เป็นสำคัญ และการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่เหมาะสม นอกจากจะเกิดผลข้างเคียงแล้วการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่เหมาะสมยังชักนำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพได้ ในปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการพัฒนาตัวเองจนมีคุณสมบัติ ในการต่อต้านยาที่เราใช้ในการควบคุมเชื่อนั้น ๆ ส่งผลให้ยาที่เราเคย ใช้ได้ผลในการรักษา ใช้ไม่ได้ผลอีกต่อไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆจากแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียในดินป่าชายเลนและดินจากแหล่งธารน้ำร้อน

ดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ดีจุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย ฟังไจสาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส มักอาศัยตามหน้าของดินยิ่งลึกลงไปยิ่งมีจุลินทรีย์น้อย และในดินที่มีอากาศถ่ายเทได้ดีจะมีจุลินทรีย์มากในกว่าดินที่มีอากาศถ่ายเทน้อยกว่าโดยทั่วไป จุลินทรีย์ในดินจะแตกต่างกันไปตามชนิดของดินแร่ธาตุและอินทรีย์สารในดินความชื้นของดิน ในปัจจัยเหล่านี้อินทรีย์สารหรือสารอาหารในดินมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างยิ่งดินที่มีสารอินทรีย์มากก็จะมีจุลินทรีย์มากด้วย

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่และพบจำนวนมากที่สุดในดินเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆจุลินทรีย์ในดินกลุ่มที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งคือ แอคติโนมัยซีต (actinomycetes) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales โดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เชื้อนี้มีลักษณะทางสัณฐานทางวิทยาที่หลากหลาย มีตั้งแต่เป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ สามารถย่อยสลายสารที่จุลินทรีย์อื่นๆ ย่อยสลายได้ยาก เช่นไขมันและไคติน เป็นต้น แอคติโนมัยซีตบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อราได้เช่นเชื้อ Streptomyces sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ที่เป็นประโยชน์แก่มนุษย์เป็นจำนวนมาก แอคติโนมัยซีตเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาและเป็นแหล่งที่ดีของการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการแพทย์และเภสัชกรรม (Madigan *et al.*, 2009)

แอคติโนมัยซีต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเฉพาะคือสร้างเส้นใย (hyphae) ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ได้ ในจลินทรีย์นี้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแอสเพอริลลัสที่เรียจะมีปริมาณของเบสกับไนโตรเจน (G+C) สูงประมาณ 55 – 78 โมลเปอร์เซ็นต์ อีกทั้งพบว่าเชื้อกลุ่มนี้ส่วนมากสามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ ได้ เช่น ขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ นอกจากนั้นแอสเพอริลลัสที่เรียส่วนใหญ่ สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง เช่น สภาวะที่มีความเค็มสูง ความเป็นกรด-ด่างสูง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และเจริญได้ในสภาวะแห้งแล้ง (Mohammadipanah and Wink, 2016) การเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะที่แตกต่างกันทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความสามารถในการทำงานแตกต่างกัน

ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้จะมุ่งเน้นไปทางการคัดแยกเชื้อแอสเพอริลลัสจากดินป่าชายเลน บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีและจากบริเวณธารน้ำร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ ด้วยวิธี Agar disc diffusion และทำการจัดจำแนกแอสเพอริลลัสโดยใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกเชื้อแอสเพอริลลัสจากดินป่าชายเลน บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
- 2) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอสเพอริลลัส
- 3) เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอสเพอริลลัสโดยวิธี agar disc diffusion

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติในบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี นำมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอสเพอริลลัส โดยทำการแยกเชื้อในอาหาร Starch Casein Agar (SCA) โดยมีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียมและอาหาร Zhang's Starch Soil Extract agar (ZSSE) และได้เติมยาปฏิชีวนะ Cycloheximide (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่ออาหาร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่บริสุทธิ์ในหลอดอาหารเลี้ยง International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) นำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion จากนั้นทำการทดสอบการจัดจำแนกแอสเพอริลลัสโดยใช้ 16s rRNA และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยสีทจากแหล่งธรรมชาติในบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
- 2) สามารถจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้นได้
- 3) สามารถทำการสกัดสารทุติยภูมิจากเชื้อแอกติโนมัยสีทเพื่อการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dis diffusion ได้
- 4) สามารถทำการทดสอบการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยการใช้ 16s rRNA และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ



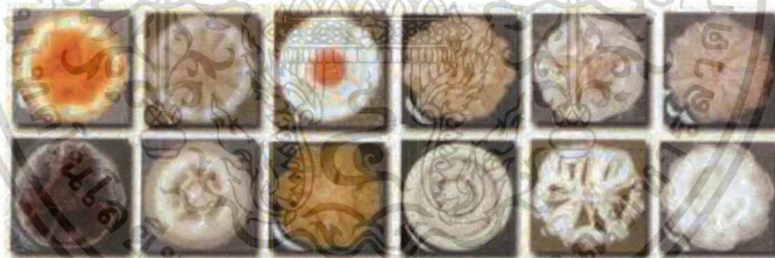
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีท (actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales โดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เชื้อนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย มีตั้งแต่เป็นทรงกลม ท่อนและเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเชื้อแอกติโนมัยสีทเป็นส่วนใหญ่ เชื้อกลุ่มนี้มีความสำคัญในการย่อยสลายอินทรีสาร ย่อยสลายเคราติน (keratin) ไคติน (chitin) เซลลูโลส (cellulose) และแป้ง (Goodfellow *et al.*, 1988) เชื้อแอกติโนมัยสีทยังสามารถสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยสีทมีความแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ คือ มีลักษณะทึบแสงสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหาร โคโลนีแห้งคล้ายผงแป้งหรือผิวโคโลนีเรียบคล้ายหนังสัตว์และมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่เมื่อสัมผัสกับตาเปล่า สามารถสร้างรงควัตถุที่มีสีต่างๆบนจานอาหาร เช่น สีขาว เทา ส้ม เหลือง น้ำตาล ชมพู และสีดำ เป็นต้น



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยสีท

ที่มา : Mahidol and Osaka University Collaborative Research Center for Biosciences and Biotechnology

2.2 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท

จัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยสีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ตามวิธีการของ The Atlas of Actinomycetes (Shinji, 1997)

2.2.1 *Micrococcus*, *Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างสปอร์ในรูปกลมและรูปแท่งได้ เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล คือ *Arthrobacter*, *Promicromonospora*, *Oerskovia*,

Dermatophilus, *Aureobacterium*, *Curtobacterium*, *Argomyces* และ *Nocardoides*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ยัดเต็มไปรษณีย์ขอคืนการคัด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 *Mycobacterium, Nocardia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล คือ *Mycobacterium, Nocardia, Gordona, Dielzia, Rhodococcus, Tsukamurella* และ *Turicella* เชื้อกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนลักษณะของผนังเซลล์พบ meso-A₂pm อยู่บน peptidoglycan

2.2.3 Family *Pseudonocardiaceae* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 6 สกุล คือ *Saccharopolypora, Actinopolyspora, Amycolatopsis, Pseudonocardia, Kibdelosporangium,* และ *Saccharomonospora* เชื้อกลุ่มนี้มี DAP บนผนังเซลล์เป็นแบบ meso-A₂pm มีน้ำตาลในเซลล์เป็นอะราบิโนสและกาแลคโทส

2.2.4 Family *Micromonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุล คือ *Actinoplanes, Dactylosporangium* และ *Pilimelia* ลักษณะสำคัญของเชื้อกลุ่มนี้ คือ สามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้โดยจะอยู่ภายใน sporangium หรือ spore vesicle พบบน substrate mycelium พบน้ำตาลไซโลสและกรดอะมิโน L-lysine บนผนังเซลล์

2.2.5 Family *Thermomonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหมด 4 สกุล คือ *Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora* และ *Actinocorallia* จัดเป็นพวกชอบร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 45-55 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์พบกรดอะมิโนแบบ meso-A₂pm ไม่พบน้ำตาลไซโลส อะราบิโนสและกาแลคโทส

2.2.6 Family *Streptosporangiaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มี ทั้งหมด 6 สกุล คือ *Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Herbidispora* และ *Streptosporangium* ผนังเซลล์พบ DAP แบบ meso-A₂pm ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก คือ ลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง sporangia รวมถึงจำนวนสปอร์ที่พบบน sporophore และ sporangia

2.2.7 Family *Streptomycetaceae*

เชื้อสกุล *Streptomyces* ถูกจัดอยู่ใน Family *Streptomycetaceae* โดยเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่มีการกระจายตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ทะเล แม่น้ำ อากาศและพบมากที่สุด在地ดิน เชื้อในกลุ่มนี้มีการสร้าง aerial mycelium จำนวนมาก และสร้างสปอร์ที่มักเป็นสายยาว

2.2.8 สกุลอื่นๆ

เชื้อในกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและเคมีอนุกรมวิธาน

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกโดยอาศัยการศึกษาจากภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจัดจำแนกเชื้อระดับสกุล (Holt, et al. 1994) ได้แก่

ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 เส้นใย (mycelium)

เส้นใยที่เกิดขึ้นแบ่งออกเป็น aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะการสร้างเส้นใยที่แตกต่างกัน จะสร้างเส้นใยทั้งสองแบบหรือแบบใดแบบหนึ่ง เชื้อบางชนิดมีการสร้างเส้นใยเฉพาะ aerial mycelium เส้นใยที่เกิดขึ้นอาจแข็งแรงหรือมีการแตกหักได้ บางชนิดเส้นใยที่แตกหักสามารถเคลื่อนที่ได้ บางชนิดเส้นใยมีลักษณะเป็น vesicle และไม่สร้างสปอร์

2.3.2 โคนิเดีย (conidia)

เป็นสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศซึ่งแอสโคดิโนมัยสีทสามารถสร้างโคนิเดียได้หลายแบบ ดังนี้

2.3.2.1 โคนิเดียเดี่ยว (single conidia) มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในกลุ่มของ *Saccharomonospora*, *Thermonospora* และ *Micromonospora* เป็นต้น บางชนิดมี endospore ที่ทนความร้อนได้ดี

2.3.2.2 โคนิเดียแบบคู่ (pairs of conidia) มีลักษณะเรียงตัวตามยาวอยู่บน aerial mycelium เช่น *Planobispora* และ *Microbispora* เป็นต้น

2.3.2.3 โคนิเดียเรียงตัวเป็นสายสั้น (short chains of conidia) มีการเรียงตัวของจำนวนสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์ เชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีหลายชนิดบางชนิดสร้างสปอร์สายสั้นและมีถุงหุ้มล้อมรอบซึ่งอาจอยู่บน aerial mycelium หรือ substrate mycelium ได้

2.3.2.4 โคนิเดียเรียงตัวเป็นสายยาว (long chains of conidia) เชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีหลายชนิด บางชนิดโคนิเดียสามารถเคลื่อนที่ได้

2.3.3 อับสปอร์

เป็นถุงที่บรรจุไว้ภายในอาจสร้างบน aerial mycelium หรือ substrate mycelium บางชนิดอาจสร้างอยู่ในเนื้อวุ้น

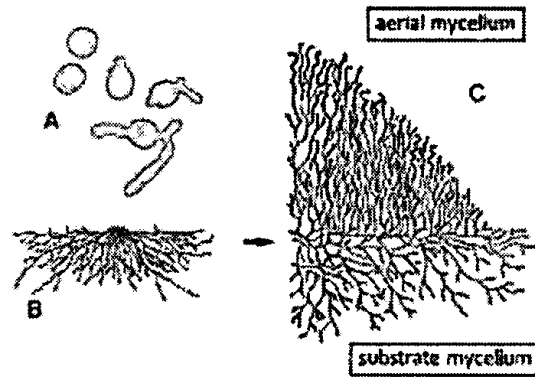
2.3.4 โครงสร้างอื่นๆ

แอสโคดิโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างลักษณะพิเศษอื่นๆ เช่น การสร้างกลุ่มสปอร์บริเวณแกนเส้นใย (multilocular sporangia)

2.4 การสร้างโคโลนีของแอสโคดิโนมัยสีท

เกิดจากการรวมตัวของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็งโดยเริ่มจากลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจจะเป็นสปอร์เดี่ยวหรืออับสปอร์ส่วนของเส้นใยที่หักหรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม (กิงจันท์, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง (Shinji, 1997)

A : อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย

B : สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปใ้อาหาร (substrate mycelium)

C : เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

2.4.1 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีท

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่น ใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* มีการเส้นใยเฉพาะ aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เรียกหรือเรียกแบบบางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่หนูน, เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ, นูน, ขรุขระหรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีแอคติโนมัยสีท (รัตนกรรณ์, 2548)

1. ลักษณะของโคโลนี (configuration) รูปร่างของโคโลนีบนจานอาหารอาจมีรูปร่างกลม (round) รูปร่างไม่แน่นอนและเจริญลามไปบนจานอาหาร (irregular and spreading) หรือเจริญเป็นเส้นคล้าย รากไม้ (rhizoid) เป็นต้น

2. ขนาด (size) โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็มจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร

3. การยกตัวของโคโลนี (elevation) จานพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหารอาจแบนราบหรือนูนจึงทำให้โคโลนีที่ยกตัวมีหลายแบบ

4. ขอบของโคโลนีจุลินทรีย์ (margin) มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ

2.4.2 โครงสร้างภายในโคโลนีของแอคติโนมัยสีท

เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4-1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกันและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ไนไซโทพลาสซึม ประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ที่ติดกับไซโทพลาสซึมอาจเกิดมีโซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

2.5 การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทที่เรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

2.5.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว (Monosporous)

ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกันและสร้างเป็นผนังสปอร์ ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยว บนสายใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์ สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยว คือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออกลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (ชัญญาภากรณ์, 2557)



รูปที่ 2.3 การสร้างสปอร์เดี่ยว (Shinji, 1997)

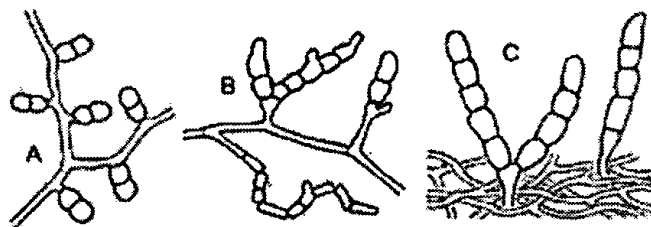
A : *Micromonospora*

B : *Thermomonospora*

C : *Saccharomonospora*

2.5.2 การสร้างสปอร์ที่เป็นสาย

ในแอกติโนมัยสีทที่เรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั้นคือ di หรือ bisporous, oligosporous หรือ polysporous



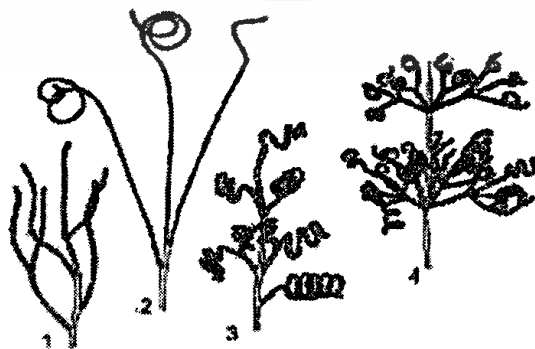
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับรูปที่ 2.4 ลักษณะสปอร์ที่เป็นสาย (Shinji, 1997) นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A : การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

B และ C : การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง (รูปที่ 2.4) แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ (รูปที่ 2.4) แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ polysporous (รูปที่ 2.5) สกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโนแบคทีเรียชนิด อื่นๆที่มีสปอร์มากกว่า มักเรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มราในกลุ่ม *Deuteromycota* ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

1. Rectiflexibles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ
2. Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
3. Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบ คือ เป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น
4. Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอยและแตกแขนงกันแน่น ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiosis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง งอ หรือ ซิกแซก



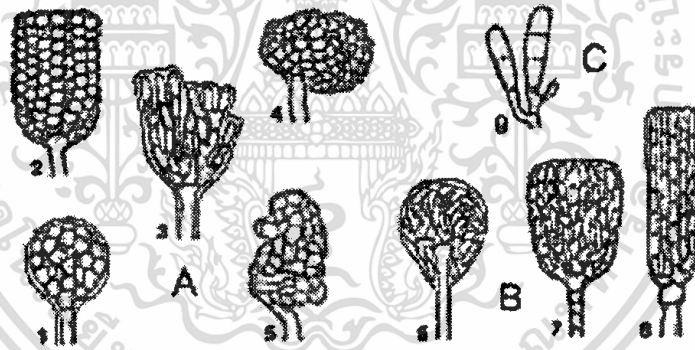
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 2.5 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* (Shinji, 1997)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1 : Rectiflexbiles
- 2 : Retinaculiaperti
- 3 : Spira
- 4 : Verticillati

2.5.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ของแอกติโนมัยสית

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์ สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

2.5.3.1 กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplanes* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลมหรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม (รูปที่ 2.5) อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10–15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือววนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ *Oliosporous* คือมีสปอร์ประมาณ 2–5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ



รูปที่ 2.6 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร (Shinji, 1997)

A : สกุล *Actinoplanes* 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู่ 4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง

B: สกุล *Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก

C: สกุล *Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก

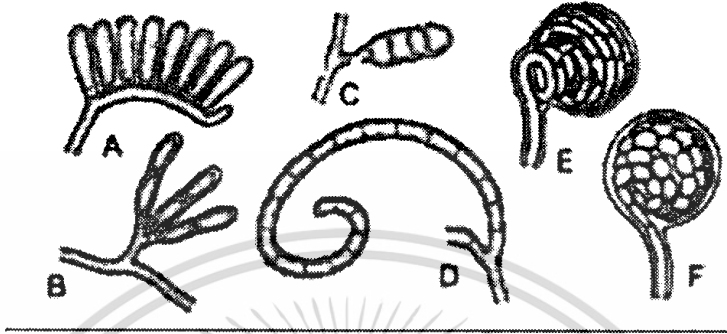
2.5.3.2 กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ (รูปที่ 2.7) ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่บนอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในสปอร์ อับสปอร์

เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์

เอกสารเมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุก *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุก *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุก *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บางๆอยู่บนก้านชูสปอร์ สกุก *Spirillospora* มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนงหรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่งและโค้งงอ



รูปที่ 2.7 รูปทรงของอับสปอร์ (Shinji, 1997)

- A: *Planomospora* : monosporous, รูปกระบอก
 B: สกุก *Planobispora* : disporous ทรงกระบอก
 C: สกุก *Planotatraspora* : tetrasporous, ทรงกระบอก
 D: สกุก *Planopolyspora* : polysporous, รูปทรงคล้ายท่อ
 E: สกุก *Spirillospora* : polysporous, ทรงกลม
 F: สกุก *Streptosporangium* : polysporous, ทรงกลม

2.6 วัฏจักรของแอกติโนมัยซีท

เริ่มจากสปอร์อิสระตกลงบริเวณที่เหมาะสมกับการเจริญ โดยมีขั้นตอน ดังนี้ (ซัญฎากาญจน์, 2557)

ขั้นตอนที่ 1 : สปอร์ที่ตกมีการงอกและสร้างเส้นใย substrate mycelium เจริญลงด้านล่างจนมีความหนาแน่นของเส้นใย

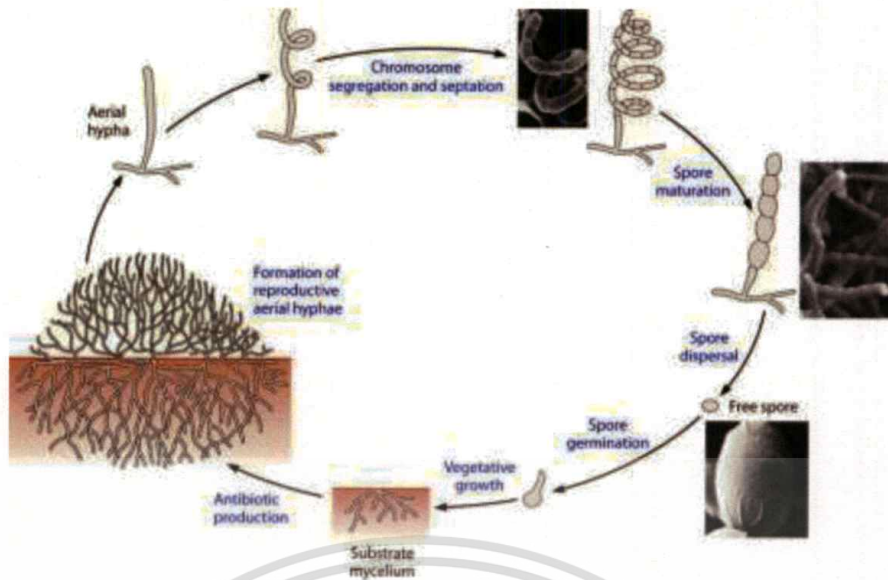
ขั้นตอนที่ 2 : เส้นใยมีความหนาแน่นมากจากนั้นมีการเจริญของเส้นใยขึ้นมาด้านบนเหนือบริเวณที่เจริญ เรียกว่า aerial mycelium

ขั้นตอนที่ 3 : เมื่อมีการเจริญหนาแน่นได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็น aerial spore เกิดการขดงอเป็นรูปร่างต่างๆ

ขั้นตอนที่ 4, 5, 6 : เส้นใยหรือผิวอาหารเปลี่ยนเป็นสปอร์จำนวนมาก

ขั้นตอนที่ 7 : โคลินี้ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยจำนวนมากเกิดสีแตกต่างกันไปและเมื่อสปอร์ตกไปในสภาวะที่เหมาะสมจะงอกเป็นเส้นใยใหม่แล้วเริ่มวงชีวิตใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท (Essaid Ait Barka *et al.*, 2015)

2.7 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอกติโนมัยสีท

2.7.1 การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

เชื้อแอกติโนมัยสีทในธรรมชาติส่วนใหญ่มีถิ่นที่อยู่อาศัยในดินมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบสารอินทรีย์วัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนต่อการย่อยสลาย ในช่วงแรกจะมีอินทรีย์วัตถุในดินมากจะมีแบคทีเรียและเชื้อราเจริญเป็นจำนวนมากและในช่วงหลังแอกติโนมัยสีทจะมีการเจริญเนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยสีทมีการเจริญช้าและเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์คู่แข่งลดปริมาณลง แอกติโนมัยสีทมีหลายชนิดและหลายสายพันธุ์จะช่วยกันย่อยสลายสารพวกกรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง ไขมันและโปรตีน (Stamford *et al.*, 2002)

2.7.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอกติโนมัยสีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม เช่น เชื้อที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมสำคัญ ได้แก่ *Thermospora* สามารถผลิตกลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ได้แก่ กลุ่ม exoglucanases และ endoglucanases นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของ *Streptomyces* หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้และบางชนิดสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแทน

2.7.3 ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้

เชื้อแอกติโนมัยสีทบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น มีรายงานว่า เชื้อสกุล *Nocardia* บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลลูโลสที่ใช้ไปและยังมีเชื้อแอกติโนมัยสีทที่อาศัยร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ คือ *Frankia* นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของเชื้อ *Streptosporangium* ที่เป็นกรดในการละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ

แอสโคไมซีตเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม (Waksman and Lechevalier, 1961) สารปฏิชีวนะที่พบส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอสโคไมซีตในสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น ampicillin และ penicillin-N มีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทมที่มีสมบัติการยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สารที่สมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ nystatin, polyoxin และ anthracycline เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ด้วยโดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถจำลองดีเอ็นเอได้

2.7.5 ความสามารถในการนำไปควบคุมโรคพืช

มีการนำเชื้อแอสโคไมซีตมาใช้ในการควบคุมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในพืช เช่น *Streptomyces lydicus* WYEC108 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราจึงมีการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอย่างกว้างขวางนอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อราและสารต่อต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ดังนั้นจึงมีการนำเชื้อแอสโคไมซีตชนิดนี้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่ทำให้เกิดโรคกับรากและเมล็ดของพืช (Mahadevan and Crawford, 1997) มีการศึกษาเชื้อแอสโคไมซีตเพื่อควบคุมเชื้อโรคพืชในสวนส้มและมะนาว พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคพืช คือ เชื้อแอสโคไมซีตในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Micromonospora* ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides, azalomycin B และสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆซึ่งสารปฏิชีวนะต่างๆที่เชื้อแอสโคไมซีตสร้างขึ้นจะทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆในดินสวนส้มและมะนาว (Gesheva, 2002)

2.8 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

2.8.1 แหล่งธาตุอาหารคาร์บอน (carbon source)

แหล่งธาตุคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อนั้นคือ กลูโคส ในขณะที่เดียวกันกลูโคสทำให้เกิดคาร์บอนเมตาโบไลต์ (carbon metabolite regulation) ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด นอกจากกลูโคสแล้วยังมีมอลโตสและกลีเซอรอล (เปรมรัตน์, 2545)

2.8.2 แหล่งธาตุไนโตรเจน (nitrogen source)

การเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเป็นอย่างมาก

2.8.3 อนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate)

อนินทรีย์ฟอสเฟตปริมาณมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และกระบวนการหายใจเป็นผลให้การเจริญเติบโตการผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.4 โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals)

โลหะหลายชนิดจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็น co-factor ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ได้แก่ Fe, Mn, Mg, Ni, Cu, Zn และ Mo จากการศึกษาอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ GMP (Glucose-meat extract peptone) ที่ทดสอบและมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะพบว่า $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอกติโนมัยซิส

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีน้ำเกลือที่สามารถพบได้ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนทั่วโลก ดินป่าชายเลนเป็นช่องทางนิเวศที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย ซึ่งใช้ในการรีไซเคิลสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมและการผลิต secondary metabolites เฉพาะที่มีความสำคัญทางเภสัชกรรม ปัจจัยหลายประการซึ่งมีความแตกต่างกันไปในระบบนิเวศของป่าชายเลนซึ่งทำให้เกิดการปรับตัวในกระบวนการ metabolites ซึ่งนำไปสู่การสังเคราะห์สารที่มีลักษณะเฉพาะ กลุ่มจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น actinomycetes เชื้อราแบคทีเรีย แผลง สาหร่ายขนาดใหญ่ และสาหร่ายขนาดเล็ก และโปรโตซัวที่คล้ายกับเชื้อราในป่าชายเลน กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งหมดในป่าชายเลนเขตร้อนประกอบด้วยแบคทีเรียและเชื้อรา 91% สาหร่าย 7% และโปรโตซัว 2% แม้ว่าจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศของป่าชายเลนก็ตาม แต่พบว่ามีเพียง 1% ของจุลินทรีย์ที่ถูกค้นพบเหลือ 99% ของจุลินทรีย์ที่ยังไม่ถูกค้นพบ แบคทีเรีย เชื้อรา และ actinomycetes ซึ่งมีเพียง 5% ของจุลินทรีย์ที่ไอโซเลทได้รับการตรวจสอบทางเคมี และสิ่งเหล่านี้รวมถึงเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และ actinomycetes (Xu, 2015)

2.9 ป่าชายเลน

ป่าชายเลน เป็นแหล่งพืชที่ขึ้นตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่มีระดับน้ำทะเลท่วมถึงในช่วงที่น้ำทะเลขึ้นสูงสุด หรือหมายถึง แหล่งพืชที่ประกอบด้วยพรรณไม้หลายชนิด หลายตระกูล และเป็นพวกที่มีใบเขียวตลอดปี (evergreen species) ซึ่งมีลักษณะทางสรีระวิทยาและความต้องการทางสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกัน (สนิท, 2542) โดยทั่วไปแล้วสภาพแวดล้อมของป่าชายเลนจะมีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากป่าชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในเรื่องของดิน ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์สูงจากธาตุอาหารที่เกิดจากการกักเก็บตามชายฝั่ง และแหล่งน้ำลำธาร สารอินทรีย์จากซากพืชซากสัตว์ โดยเฉพาะใบไม้ที่ทับถมกันเป็นจำนวนมาก รวมถึงแพลงค์ตอนพืชและสาหร่าย น้ำบริเวณป่าชายเลนมีความเค็มค่อนข้างต่ำ ระดับความเค็มมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำจืดที่มาจากแม่น้ำลำคลองและระดับน้ำที่ขึ้นลงและง

ป่าชายเลนเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญของระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งทะเลและมหาสมุทรที่มีพื้นที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่โลก และเป็นแหล่งที่มีการศึกษาทางด้านแอกติโนมัยซิส (วสุ และคณะ, 2554)

2.9.1 ลักษณะดินป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในจังหวัดชลบุรีดินป่าชายเลนมีความลึกของชั้นหน้าตัดดินประมาณ 50 เซนติเมตร ลักษณะดินที่พบประมาณร้อยละ 99 เป็นดินเหนียวส่วนมากเนื้อดินเป็นเนื้อละเอียดมาก คือเม็ดดินมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ไม่มีกลิ่นหรือจะมีกลิ่นของซากพืชซากสัตว์ สีของดินที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มสีเทาโดยแบ่งเป็นสีเทาอมฟ้า (G2) และสีเทาอมเขียว (G1) และส่วนที่เหลือมีสีอยู่ในกลุ่มสีน้ำตาล (7.5YR) ที่ความลึก 0-5 เซนติเมตร อุณหภูมิดินเฉลี่ยอยู่ที่ 28.5 องศาเซลเซียส มีค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 6.60 – 5.50 ที่ความลึก 5-40 เซนติเมตร อุณหภูมิดินเฉลี่ยอยู่ที่ 27.5 องศาเซลเซียส มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.60 – 7.50 จึงจัดอยู่ในกลุ่มดินที่เป็นกลาง พื้นที่ผิวหน้าตัดส่วนมากพบรากไม้ปะปนและจุดประในชั้นหน้าตัดดินระหว่างร้อยละ 2-20 และมีหินปะปนในชั้นหน้าตัดดินประมาณร้อยละ 20 ของพื้นที่ผิว ปริมาณคาร์บอนอยู่ในช่วง 2.06-3.47 กรัม ปริมาณคาร์บอนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 2.64 ปริมาณไนโตรเจนอยู่ในช่วง 0.27-0.32 กรัม ปริมาณไนโตรเจนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.29 และมีปริมาณฟอสฟอรัสรวมอยู่ในช่วง 0.045-0.092 กรัม ปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.069 จากการสำรวจพบว่าดินป่าชายเลนในจังหวัดชลบุรีมีคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีที่ค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดความลึกของชั้นดิน (ศุภชัยวิชัยป้าไม้, 2553)



รูปที่ 2.9 ป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ชลบุรี (การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย)

2.9.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากดินป่าชายเลน

ในช่วงที่ผ่านมา มีรายงานในเรื่องของการค้นพบแอกติโนมัยสีทสกุลใหม่เป็นจำนวนมากจากทะเลและมหาสมุทร ดังนั้นการค้นหาเชื้อแอกติโนมัยสีทจากแหล่งธรรมชาติใหม่ๆ เช่น จากดินตะกอนทะเล หรือจากดินตะกอนป่าชายเลนในเขตร้อนของประเทศไทยซึ่งยังไม่ค่อยมีการศึกษาค้นคว้ามากนัก จึงเป็นความคาดหวังของคณะผู้วิจัยที่จะค้นพบแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่เพื่อช่วยแก้ปัญหาการดื้อยา ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดดื้อยามากขึ้นทำให้การรักษาเริ่มหมดประสิทธิภาพลง เช่น *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์ที่มีแหล่งที่มาจากโรงพยาบาลสามารถดื้อยาที่ใช้รักษาได้หมดทุกชนิดจึงมีความ

จำเป็นอย่างมากในการหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรครดดังกล่าว แต่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ในช่วง 20 กว่าปีที่ผ่านมา มีรายงานการพบสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยสีทที่จะนำมาพัฒนาต่อไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยลง โดยพบว่าสารที่พบเป็นชนิดที่เคยรายงานมาแล้ว ในการศึกษาผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่าง ตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนในภาคตะวันออกของประเทศไทย นำมาแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทและศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อที่แยกได้รวมทั้งทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพและการนำเชื้อที่มีศักยภาพมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร การแพทย์ และทางเภสัชวิทยาในอนาคตต่อไป (วสุ และคณะ, 2554)

แอกติโนมัยสีทอาศัยอยู่ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ และใน เนื้อเยื่อพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมของสารอินทรีย์ เช่น โคลนตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ ทะเล ดิน บริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน แอกติโนมัยสีทจะพบมากในดินที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมี ความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.5-8.0 โดยส่วนใหญ่แอกติโนมัยสีทในดิน คือ Streptomyces พบประมาณ 70-90% รองลงมา คือ Nocardia พบประมาณ 10-30% และ Micromonospora 115% แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส บาง สายพันธุ์เป็น thermophile สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 45-60 องศาเซลเซียส (ลลิตา, 2554) นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดินด้วย โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงจะ กระตุ้นกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ในดินได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (กฤติมา, 2548) สภาพแวดล้อมของ น้ำพุร้อนจะมีความแตกต่างจากที่อยู่บนดิน (terrestrial habitat) อย่างมาก ซึ่ง คาดว่าลักษณะทางชีวภาพและการแพร่กระจายของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากน้ำพุร้อนจะมีความแตกต่างกับแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินทั่วไป การวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทจากน้ำพุร้อนไม่ได้ ให้ความสำคัญในเรื่องของการศึกษาขั้นพื้นฐานเท่าที่ควรแต่ยังจำเป็นต่อการนำไปใช้ประโยชน์อีกด้วย นอกจากนี้สภาพแวดล้อมของน้ำพุร้อนยังแสดงให้เห็นว่า น้ำพุร้อน เป็นแหล่งสำคัญที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ๆทางธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งก็คือสารปฏิชีวนะ (Thawai, 2012)

2.10 น้ำพุร้อน (กรมทรัพยากร, 2560)

น้ำพุร้อนเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่มีน้ำร้อนไหลขึ้นมาจากใต้ดิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ภายในโลกยังคงมีความร้อนอยู่ ปัจจุบันพบแหล่งน้ำพุร้อน 112 แหล่ง กระจายอยู่ทั่วไปตั้งแต่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคใต้ วัตถุประสงค์ของน้ำพุร้อนที่ผิวดินอยู่ในช่วง 40 – 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ น้ำพุร้อนยังสามารถนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การผลิตกระแสไฟฟ้า ด้านอุตสาหกรรม และการเกษตรกรรมอีกด้วย

2.10.1 ชารน้ำร้อนบ่อคลึง

2.10.1.1 ที่ตั้ง

บ้านบ่อคลึง ตำบลสวนผึ้ง อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี

2.10.1.2 ลักษณะธรณีวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณแหล่งน้ำพุร้อนเป็นเมืองแร่ดีบุกเก่า ประกอบด้วยหินแกรนิตเนื้อดอก หินเพกมาไทต์ และหินแอพลต์ แร่ประกอบหินแกรนิต มีขนาดหยาบปานกลางจนถึงหยาบมาก ประกอบด้วยแร่ทิวมาสีน มัสโคไวต์ ไบโอไทต์ ควอตซ์ และเฟลสปาร์ อายุของหินแกรนิตอยู่ระหว่าง จูแรสซิก-ครีเทเชียส

2.10.1.3 ลักษณะทางกายภาพ

เป็นบ่อน้ำอุ่นเกิดอยู่ในหุบเขาริมห้วยป๋อคลึง น้ำพุร้อนเกิดอยู่หลายบริเวณเรียงตัวอยู่ในแนวตามร่องห้วย แล้วไหลไปตามร่องห้วยทิศประมาณ N30E พบสาหร่ายสีเขียวอ่อนมาก ร่องห้วยลึกประมาณ 50 เซนติเมตร บริเวณปลายร่องห้วยที่อยู่ห่างจากต้นกำเนิดน้ำพุร้อน 130 เมตร จะทำเป็นแอ่งน้ำธรรมชาติ กั้นน้ำร้อนไว้เพื่อใช้เป็นที่พักน้ำพุร้อน แอ่งน้ำร้อนนี้ลึกประมาณ 1 เมตร นอกจากนี้ ได้ต่อท่อน้ำเหล็กจากต้นกำเนิดน้ำพุร้อนไปสู่สระว่ายน้ำที่ก่อด้วยกระเบื้องสำหรับอาบน้ำพุร้อนที่อยู่ ห่างออกไปประมาณ 60 เมตร ต้นกำเนิดของแหล่งน้ำพุร้อน สันนิษฐานว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับ รอยเลื่อน และรอยแยก 2 ทิศทาง ได้แก่ รอยเลื่อนในทิศทางตะวันตกเฉียงเหนือ-ตะวันตกเฉียงใต้ และทิศทางตะวันตกเฉียงเหนือ-ตะวันออกเฉียงใต้

2.10.1.4 ลักษณะทางเคมี

น้ำพุร้อนเป็นน้ำใส สะอาด ไม่มีกลิ่นกำมะถันและก๊าซไข่เน่า พบก๊าซผุดขึ้นมาในน้ำพุร้อน และในลำห้วยบ้างเป็นจำนวนไม่มาก พบแร่แปรสภาพพวกคาร์บอเนตและซิลิกา มองเห็นเป็นตะกอนและคราบผลึกคาร์บอเนตสีขาว บนหินและ ดินรอบๆ บ้างเล็กน้อย ปริมาณของไบคาร์บอเนตและฟลูออไรด์ค่อนข้างสูง ปริมาณซัลเฟตน้อยมาก ปริมาณสารละลายทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำร้อนต่ำมาก



รูปที่ 2.10 ธารน้ำร้อนป๋อคลึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยการใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ

การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทแบบที่เรียกในปัจจุบันเป็นไปตามหลักของ polyphasic taxonomy ซึ่งอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์มาประกอบซึ่งประกอบไปด้วย phylogenetic และ phenetic approaches การจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค phylogenetic identification เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit (SSU) ribosomal DNA หรือ 16S rDNA ปรากฏอยู่ในวารสารวิชาการนานาชาติที่ได้รับการยอมรับ เช่น International Journal of Systematic and Applied Microbiology (IJSEM), Systematic and Applied Microbiology เป็นต้น

2.11.1 Ribosomal RNA และการใช้ 16s rRNA gene

โพรคาริโอตมีขนาดไรโบโซม 70s ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยขนาดใหญ่ 50s และหน่วยขนาดเล็ก 30s ในหน่วยใหญ่นั้นประกอบด้วย โพรตีน 34 ชนิด 5s rRNA ขนาดโดยประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์และ 23s rRNA ขนาดโดยประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ ส่วนในหน่วยเล็กนั้นประกอบด้วย โพรตีน 21 ชนิด 16s rRNA ขนาดโดยประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ (ลัดดา, 2547) สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมี rRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะจึงสามารถที่จะใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์กันระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Madigan, 2006)

ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมนิยมใช้ 16s rRNA gene เนื่องจากมีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอในการจัดกลุ่มหรือบอกความสัมพันธ์ซึ่งถ้าหากยีนมีความแปรผันสูงจะทำให้เกิดการกลาย (mutation) สูงอาจส่งผลให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หายไปและไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ (Madigan, 2006)

2.11.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การจัดจำแนกเชื้อในวงศ์ (family) Streptomycetaceae โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Ribosomal RNA gene เช่น ส่วน 16s rRNA gene ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรตีนและส่วนที่ไม่ใช่รหัส สามารถแยกเชื้อได้ตั้งแต่ระดับวงศ์จนกระทั่งถึงระดับสายพันธุ์ (Huddleston *et al.*, 1997) มีรายงานในเรื่องของการอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16s rRNA gene มาทำการจัดจำแนกเชื้อกลุ่ม acidophilic actinomycetes ที่แยกได้จากดิน พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ JL 164 มีความใกล้เคียงกับ *S. mirsibilis* และสายพันธุ์ CN723^T ระบุได้ว่าเป็น *S. yeovhonensis* (Kim *et al.*, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ของ universal primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่มีความเกี่ยวข้องกับ 16s rRNA gene

Name of primer	Nucleotide (5'-3')	References
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
F8	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Gee <i>et al.</i> , 2003
R1492	ACCTTGTTACGACTT	
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	Song <i>et al.</i> , 2004
rF2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
F1	AGAGTTTGATCITGGCTCAG	Cook, 2003
R5	AGCCITACCTTGTTACGACTT	
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Shrout <i>et al.</i> , 2005
1525R	AGGAGGTGATCCAGCC	

***หมายเหตุ I = inosine

DNA sequencing analysis คือ การตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบสโดยเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิด คือ A T C G ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึง การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสและยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide base เทคนิค DNA sequencing analysis ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อนโดยใช้เครื่องมือ Automatic machine ซึ่งใช้เอนไซม์ DNA polymerase 1 ในการสร้างสายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำการเปลี่ยนดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยการใช้ความร้อน (denature) และใช้ sequencing primer จับกับดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งจะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ มีการเติมสาร Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) ลงในปริมาณที่เพียงพอเพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์ในการจบการสังเคราะห์ ชั้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นจะมีขนาดที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ภายในสายแปลผลเป็น A T C G โดยข้อมูลที่ได้นั้นจะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้ผลออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (Mulhardt, 2007) มีรายงานการจัดจำแนกชนิดของแอกติโนมัยสีทที่แยกจากดินโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s DNA พบว่าทุกสายพันธุ์เป็นสกุล *Streptomyces* อาจเป็นผลมาจากสกุล *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีความหลากหลายสูงสุดในดิน (ธวัชชัย และคณะ, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase chain reaction)

PCR ย่อมาจาก Polymerase Chain Reaction คือ กระบวนการในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลอง โดยวิธีการได้เลียนแบบมาจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) ในสิ่งมีชีวิต ผู้คิดค้นเทคนิค PCR นี้ คือ Kary Mullis ซึ่งนักวิจัยโดยส่วนมากจะใช้เทคนิค PCR นี้ในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา

PCR มีอยู่ 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

2.11.3.1 Denaturing คือ เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ (DNA) ที่เป็นเกลียวคู่ หรือ Double Strand DNA (คือ สภาพ Native DNA) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆจนกลายเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายเดี่ยว หรือ Single Strand DNA (คือ สภาพ Denatured DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส

2.11.3.2 Annealing คือ เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆและใส่ไพรเมอร์ (Primer, short DNA) ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (Complementary base pair) ระหว่างไพรเมอร์ (Primer) กับ Template DNA โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

2.11.3.3 Extension คือ เป็นขั้นตอนการใส่ DNA polymerase ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) สายใหม่ หรือ เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ (DNA) ให้มากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบสำคัญในการทำ PCR ได้แก่

- ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA)
- เอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อน (*Taq* DNA polymerase)
- Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)
- PCR buffer
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- เครื่องมือในการทำ PCR เช่น Thermal cycler หรือ PCR machine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- | | | |
|--------|--|--|
| 3.1.1 | ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) | รุ่น 120 BS ยี่ห้อ Super clean, Major scientific Thailand |
| 3.1.2 | ตู้อบด้วยความร้อนแห้ง | รุ่น 110 บริษัท Memmert, Germany |
| 3.1.3 | เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | รุ่น GF-800 ยี่ห้อ AND, Japan |
| 3.1.4 | เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) | รุ่น Starter 3000 ยี่ห้อ OHAUS, USA |
| 3.1.5 | ตู้อบเชื้อ (Incubator) | รุ่น 1300 ยี่ห้อ Contherm, New Zealand |
| 3.1.6 | หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) | รุ่น ES-315 ยี่ห้อ TOMY, Japan |
| 3.1.7 | เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer) | รุ่น Vortex-gein 2, 230v-g560e บริษัท Scientific industries, USA |
| 3.1.8 | กล้องจุลทรรศน์ | รุ่น CH30 ยี่ห้อ Olympus, Japan |
| 3.1.9 | เครื่องไมโครเวฟ | รุ่น R-250 sharp, Thailand |
| 3.1.10 | เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ | รุ่น Z383K ยี่ห้อ HERMLE, Germany |
| 3.1.11 | เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ | ยี่ห้อ Gallenkamp, UK |
| 3.1.12 | เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) | ยี่ห้อ HEIDOLPH, Germany |
| 3.1.13 | เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) | HERMEL Labotechnik |

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petridish)
- 3.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.3 ทิป (Tip)
- 3.2.4 Auto pipette ขนาด 200 ไมโครลิตร
- 3.2.5 ช้อนตักสาร
- 3.2.6 ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.2.7 บีกเกอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
2.2.8 ขวดดูแรน (Durhan)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อแหล่งอื่นและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.9 แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
- 3.2.10 ปิเปตแก้ว
- 3.2.11 ขวดรูปชมพู่ (Flask)
- 3.2.12 ลูกยาง
- 3.2.13 หลอดทดลองและฝาปิด
- 3.2.14 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย
- 3.2.15 ปากคีบ (Forceps)
- 3.2.16 เข็มเย็บเย็บปลายแหลม (needle)
- 3.2.17 ไม้พันสำลี
- 3.2.18 กระจกทรงวอทแมน เบอร์ 1
- 3.2.19 แผ่นทดสอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Disc)
- 3.2.20 สำลี
- 3.2.21 Centrifuge tube
- 3.2.22 Microcentrifuge tube
- 3.2.23 ขวดปรับปริมาตร
- 3.2.24 Appendroph
- 3.2.25 หลอดหยดสาร
- 3.2.26 กรวยแยก
- 3.2.27 ขวด vial
- 3.2.28 เวอร์เนียคาลิเปอร์

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- 3.3.2 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
- 3.3.3 น้ำตาลกลูโคส (Glucose) MW 180.1559 g/mol
- 3.3.4 วุ้น (Agar)
- 3.3.5 แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)
- 3.3.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) MW 58.44 g/mol
- 3.3.7 เคซีน (Casein)
- 3.3.8 แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄)
- 3.3.9 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃) MW 100.0869 g/mol
- 3.3.10 Dipotassium hydrogen phosphaté (K₂HPO₄) MW 174.1759 g/mol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น ยินดีที่จะเผยแพร่เอกสารนี้ให้ผู้อื่นได้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 นำไปใช้

- 3.3.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.3.12 สารละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue)
- 3.3.13 น้ำกลั่น
- 3.3.14 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.3.15 น้ำตาลไซโลส (Xylose) MW 150.13 g/mol
- 3.3.16 น้ำตาลแลคโตส (Lactose) MW 342.30 g/mol
- 3.3.17 น้ำตาลซูโครส (Sucrose) MW 342.30 g/mol
- 3.3.18 คลอโรฟอร์ม (CHCl₃) = 119.38 g/mol
- 3.3.19 เปปโตน (peptone)
- 3.3.20 โพแทสเซียมไนเตรท (KNO₃) MW 101.11 g/mol
- 3.3.21 เจลาติน (Gelatin)
- 3.3.22 Acid Hydrolysate of Casein
- 3.3.23 skim milk
- 3.3.24 เกลือทะเล (artificial seawater)
- 3.3.25 Ammonium molybdate tetrahydrate MW 1235.9975 g/mol
- 3.3.26 Ethyl acetate (C₄H₈O₂) MW 88.1051 g/mol
- 3.3.27 Ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) MW 132.1395 g/mol
- 3.3.28 Kanamycin ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.3.29 Manganese (II) Chloride Tetrahydrate (MnCl₂•4H₂O) MW 521.3915 g/mol
- 3.3.30 Zinc Sulfate Heptahydrate (ZnSO₄•7H₂O) MW 287.5496 g/mol
- 3.3.31 Phenol (C₂H₅OH)MW 94.1112 g/mol
- 3.3.32 เมทานอล MW 32.0419 g/mol
- 3.3.33 กรดอะซิติก MW 60.0520 g/mol
- 3.3.34 กรดซัลฟาลินิก
- 3.3.35 สารละลาย N,N-Dimethyl-L-naphthylamine
- 3.3.36 แมนนิทอล
- 3.3.37 Molybdenum Blue spray reagent
- 3.3.38 สารละลายมาตรฐาน McFarland standard No.0.5
- 3.3.39 cyclohexamide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.4.1 Starch – Casein agar (SCA)
- 3.4.2 Zhang’s Starch Soil Extract agar (ZSSE)
- 3.4.3 Yeast extract – Malt extract agar (YEME agar)
- 3.4.4 Yeast extract – Malt extract broth (YEME broth)
- 3.4.5 International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)
- 3.4.6 Inorganic salts starch agar no.4 (ISP4)
- 3.4.7 Bouillon gelatin broth
- 3.4.8 Nutrient agar
- 3.4.9 Skim milk agar
- 3.4.10 Muller Hinton agar (MHA)
- 3.4.11 Sabourand Dextrose agar (SDA)
- 3.4.12 Phenol Red glucose (or other sugar) broth

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- 3.5.1 แบคทีเรียในการทดสอบ
 - 3.5.1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633
 - 3.5.1.2 *Escherichia coli* ATCC 25922
 - 3.5.1.3 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
 - 3.5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 3.5.1.5 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 3.5.2 ยีสต์ในการทดสอบ
 - 3.5.2.1 *Candida albicans* ATCC 10231

3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2017)

เลือกจุดเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม ก่อนทำการเก็บตัวอย่างให้กวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นทำการขุดดินลึกลงไปประมาณ 5-10 เซนติเมตร ใช้ช้อนปลูกตักดินใส่ในถุงพลาสติกใส โดยรัดปากถุงหลวมๆ ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ไม่ว่ากรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างของดินด้วย pH meter ทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างประมาณ 300-700 กรัม โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บ และค่าความเป็นกรดต่างที่วัดได้

3.6.2 การเพาะเลี้ยง การแยก และการเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีท (Takizawa *et al.*, 1993)

นำตัวอย่างดินที่เก็บมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มเพลท ทำการตากดินให้แห้งสนิทเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Colwell RR, 1993) แล้วชั่งดินมา 10 กรัม โดยจะทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ

3.6.2.1 นำตัวอย่างดินใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.9% (NaCl) ปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้ดินตกตะกอนเป็นระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางให้มีระดับความเจือจาง $10^{-2} - 10^{-5}$ โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปลอดเชื้อเป็นสารละลายที่ใช้ในการเจือจาง

3.6.2.2 นำตัวอย่างดินใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มี 0.1% tween 80 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้ดินตกตะกอนเป็นระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางให้มีระดับความเจือจาง $10^{-2} - 10^{-5}$ โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปลอดเชื้อเป็นสารละลายที่ใช้ในการเจือจาง

จากนั้นทำการคัดสรรละลายตัวอย่างที่เจือจาง (ดังวิธีการที่ 3.6.2.1 และ 3.6.2.2) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร Starch – Casein agar (SCA) โดยมีส่วนผสมของเกลือเทียม (artificial seawater 18.5 g./500 mL.) (Wellington and Cross, 1983) และอาหาร Zhang's Starch Soil Extract agar (ZSSE) (Waksman, 1961) ที่เติมยาปฏิชีวนะ cyclohexamide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่ออาหาร 500 มิลลิลิตร แล้วบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7-14 วัน (เช็คดูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์)

3.6.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน (Klanbut, 2017)

3.6.3.1 การหาน้ำหนักดิน

ทำการนำกระดาษฟอยล์มาทำเป็นกระถางแล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักก่อนใช้ นำตัวอย่างดิน 2-3 กรัมใส่ลงในกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมด และน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของกระดาษฟอยล์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ จากผลต่างของน้ำหนักกระดาษฟอยล์ก่อนและหลังอบ

3.6.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ทำการนำกระดาษฟอยล์มาทำเป็นกระถางแล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักก่อนใช้ นำตัวอย่างดิน 2-3 กรัมใส่ลงในกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ เอกสารนี้เผยแพร่เพื่อประโยชน์สาธารณะโดยไม่แสวงหากำไร การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.3 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยข้อตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที – 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

3.6.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา (Williams and Cross, 1971)

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.6.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) ที่มีส่วนผสมของเกลือเทียม (artificial seawater 18.5 g./500 mL.) เติมนยาปฏิชีวนะ cyclohexamide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่ออาหาร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารแข็ง International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลท

3.6.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ (Arumugam et al., 2017)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) โดยวิธี Cross steak ตรวจสอบผลโดยการดูการเจริญของเชื้อ สีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) ตรวจสอบดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.6.6 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ

3.6.6.1 การย่อยสลายโปรตีนในนม Peptonization (ลักษมี, 2556)

เชื้อเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 1 หลูปลงในอาหาร skim milk agar เป็นเส้นตรงตามแนวยาว จากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง จากนั้นนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น จะเกิดวงใสรอบโคโลนี บันทึกผลเป็น

- + เมื่อมีการย่อยโปรตีนในนม เกิดบริเวณใส รอบรอยขีดของเชื้อแอกติโนมัยซีท
- เมื่อไม่มีการย่อยโปรตีนในนม ไม่เกิดบริเวณใส รอบรอยขีดของเชื้อแอกติโนมัยซีท

3.6.6.2 การย่อยสลายเจลาติน (กุสุมา และคณะ, 2557)

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหาร Bouillon Gelatin broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้ไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินก็จะไม่เกิดการแข็งตัวของอาหาร

- + เมื่อมีการย่อยเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของอาหาร
- เมื่อไม่มีการย่อยเจลาตินจะเกิดการแข็งตัวของอาหาร

3.6.6.3 การย่อยสลายแป้ง (กุสุมา และคณะ, 2557)

เลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนอาหาร Inorganic salt-starch agar (ISP4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบโดยเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงบ่มอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้น จะเกิดเป็นบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดเป็นสีน้ำเงิน บันทึกผลเป็น

- + เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้ง จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ
- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายแป้ง จะไม่เกิดบริเวณใส (Clear Zone) รอบโคโลนีของเชื้อ

3.6.6.4 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ไซโลส และ แมนนิทอล (ลักขมี, 2556)

ศึกษาการหมักน้ำตาล โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหาร Phenol Red glucose (or other Sugar) broth (pH 7.4) ที่ใส่หลอดดักแก๊ส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 10-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหาร บันทึกผลเป็น

- | | |
|--------------|---|
| A (Acid) | เมื่อมีการหมักน้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง |
| K (Alkaline) | เมื่อไม่เกิดการหมักน้ำตาล |
| W (Weakly) | เมื่อเกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อย สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงสีส้ม |
| + | เมื่อมีการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส |
| - | เมื่อไม่มีการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส |

3.6.6.5 Oxidase test (ดวงพร, 2535)

ทำการตัดกระดาษกรอง Whatman No.1 เป็นขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำกระดาษกรองที่ตัดได้มาวางลงบนเพลทที่ปลอดเชื้อ แล้วทำการหยดสาร Tetramethyl-p-phenylenediamine (TPD) ให้ซึมทั่วกระดาษกรอง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อที่มีอายุไม่เกิน 5 วัน ลงบนกระดาษกรอง บันทึกผลเป็น

- + เมื่อเกิดสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ Oxidase
- เมื่อไม่มีการเกิดสี แสดงว่าเชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ Oxidase

3.6.6.6 Catalase test (Kovacs, 1999)

ทำการเขี่ยเชื้อโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อลงบนเพลทที่ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการหยดสาร

เอกสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% (H_2O_2) บันทึกผลเป็นอนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- + เมื่อมีการเกิดฟอง แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ Catalase
- เมื่อไม่มีการเกิดฟอง แสดงว่าเชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ Catalase

3.6.7 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Preliminary test) (Meena *et al.*, 2013)

ทำการคัดเลือกเชื้อบนอาหาร Yeast Extract – Malt Extract (YEME) โดยขีดเส้นเป็นเส้นตรงตามแนวยาวจากด้านหนึ่งไปสู่อีกด้านหนึ่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการทดสอบกับเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยลากเชื้อทดสอบ ตั้งฉากกับเชื้อแอสคิตโนมัยสึ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สังเกตระยะห่างระหว่างแนวการเจริญของแอสคิตโนมัยสึกับเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น จากการศึกษานี้จะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในเบื้องต้น

3.6.8 การทดสอบกิจกรรมด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar disc diffusion (Phongsopitanun *et al.*, 2014)

3.6.8.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยสึ

ทำการ cấyเชื้อแอสคิตโนมัยสึจำนวน 1 หลูใส่ลงในอาหาร Yeast extract-Matt extract (YEME) บ่มไว้ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติม 0.1% CaCO₃ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงต่อไว้ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.6.8.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของเชื้อแอสคิตโนมัยสึ

นำน้ำหมักเชื้อแอสคิตโนมัยสึที่ได้จากข้อ 3.6.8.1 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ขนาด 90 มิลลิเมตร เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอสคิตโนมัยสึออกจากอาหารเหลว จากนั้นนำส่วนของน้ำหมักที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัด โดยใช้เอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทำการเติมลงไปในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในส่วนของเอทิลอะซิเตทมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากส่วนของน้ำหมัก เลือกส่วนของเอทิลอะซิเตทนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง ทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอสคิตโนมัยสึที่ได้มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ขนาด 90 มิลลิเมตร เพื่อแยกเอาเส้นใยออกจากสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดเมทานอล จากนั้นนำไปประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.6.8.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (วสุ, 2554)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Normal Saline) ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland standard No. 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 CFU/ml

3.6.8.4 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมอาหาร Mueller's hinton agar (MHA) สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อทดสอบยีสต์โดยทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ จากนั้นเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งไว้ให้แห้งตัว

3.6.8.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Swab) ชุบเชื้อที่แขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6.8.3 แล้วทำการ (Swab) ลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.6.8.4 ให้ทั่วด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากข้อ 3.6.8.2 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร และวางลงบนอาหารที่ Swab เชื้อไว้แล้วจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสาร ซึ่งสารสกัดจะแพร่ออกกระจายตัวรอบแผ่นทดสอบ การมีสารสกัดฤทธิ์ยับยั้งจะเกิดวงใสรอบแผ่นทดสอบตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์

3.6.9 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทโดยการใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ Phylogenetic tree (คะนิงกานต์, 2560)

ทำการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินธารน้ำร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ นำมาเลี้ยง

บนอาหารแข็ง International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) เป็นเวลา 1 วัน
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการสกัด DNA โดยใช้วิธี 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) นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ตรงกันด้วยสายพันธุต้นแบบจาก EzBioCloud เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BioEdit Sequence Alignment Editor จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง Phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ข้อมูลที่คล้ายกันมากที่สุดจะถูกจับคู่และบันทึกความเป็นไปได้ในการจัดจำแนกแผนภูมิต้นไม้ถูกสร้างโดยใช้ neighbour o-joining (Saitou & Nei, 1987), มีขั้นตอนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ใน Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7) software package version 6.06 (Tamura K *et al.*, 2004) ระยะวิวัฒนาการของ aurus o-joining (Kimura, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแอกคติโนมัยสีท

จากการเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนแบบสุ่ม บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ดังวิธีการที่ 3.6.1 โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด และนำมาคัดแยกเชื้อแอกคติโนมัยสีท ดังวิธีการที่ 3.6.2 จนได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 15 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 หมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอกคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่างดิน	หมายเลขไอโซเลท
จุดที่ 1	-
จุดที่ 2	SM 0212103
จุดที่ 3	SM 0311102, SM 1322211
จุดที่ 4	SM 1412105, SM 1422110, SM 1412112
จุดที่ 5	SM 1512115
จุดที่ 6	SM 1622107
จุดที่ 7	SM 0711201, SM 1712108, SM 1712113
จุดที่ 8	-
จุดที่ 9	SM 1922104, SM 1922106, SM 1912109, SM 1912114
จุดที่ 10	-

***หมายเหตุ : ตัวหนังสือ คือ สถานที่เก็บตัวอย่างดิน

ตัวเลขตำแหน่งที่ 1 และ 2 คือ จุดที่เก็บตัวอย่างดิน (ครั้งที่ 1 คือ เลข 1-10, ครั้งที่ 2 คือ เลข 11-20)

ตัวเลขตำแหน่งที่ 3 คือ อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (หมายเลข 1 คือ SCA, หมายเลข 2 คือ ZSSE)

ตัวเลขตำแหน่งที่ 4 คือ สารที่ใช้ในการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} (หมายเลข 1 คือ NaCl, หมายเลข 2 คือ tween 80)

ตัวเลขตำแหน่งที่ 5 คือ ระดับความเจือจาง (หมายเลข 1 คือ 10^{-1} , หมายเลข 2 คือ 10^{-2} , หมายเลข 3 คือ 10^{-3})

ตัวเลขตำแหน่งที่ 6 และ 7 คือ ลำดับไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 สมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด นำมาหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน ประกอบด้วย 3 การทดสอบ ได้แก่ การหาน้ำหนักดิน (วิธีการที่ 3.6.3.1), การหาปริมาณความชื้น (วิธีการที่ 3.6.3.2) และการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (วิธีการที่ 3.6.3.3) ดังแสดงตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (g)	ปริมาณความชื้น (%)	ค่าความกรด-ด่าง
จุดที่ 1	1.922	51.74	7.1
จุดที่ 2	1.341	39.03	7.0
จุดที่ 3	1.416	46.48	7.2
จุดที่ 4	1.231	43.20	7.1
จุดที่ 5	1.467	41.83	7.0
จุดที่ 6	1.412	48.24	7.0
จุดที่ 7	1.678	48.74	7.1
จุดที่ 8	1.368	37.75	7.2
จุดที่ 9	1.598	54.53	7.1
จุดที่ 10	1.381	40.64	7.0

จากการหาปริมาณความชื้นในความเป็นจริงหากใช้ดินที่เก็บมาใหม่ที่ยังไม่ได้ทำการตากจะได้ปริมาณความชื้นเป็น 100% แต่จากการทดลองได้ใช้ดินที่ตากไว้เป็นเวลา 7-14 วัน ซึ่งทำให้ปริมาณความชื้นที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า 100%

4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทถูกทำการแยกเป็นโคลนเดี่ยวด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้จำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลท ทำการคัดแยกสีของเส้นใยในอากาศ (aerial mycelium) สีของเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) โดยเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ดังวิธีการที่ 3.6.6) ตรวจสอบลักษณะเส้นใยและสปอร์ด้วยวิธี slide culture (ภาคผนวก ง) โดยทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (แสดง

ดังตารางที่ 4.3) เพื่อให้เห็นลักษณะของเส้นใยและการเรียงตัวของสปอร์อย่างชัดเจน พบว่าได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1.1 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสปีชีส์ไอโซเลท SM0311102 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light gray สร้างเส้นใยอาหารสี Brilliant yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสปีชีส์ไอโซเลท SM0311102 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

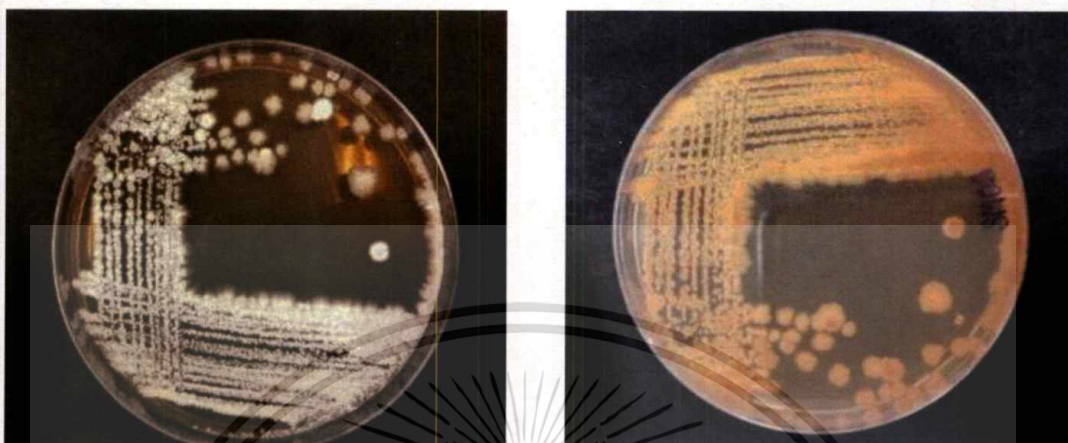
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

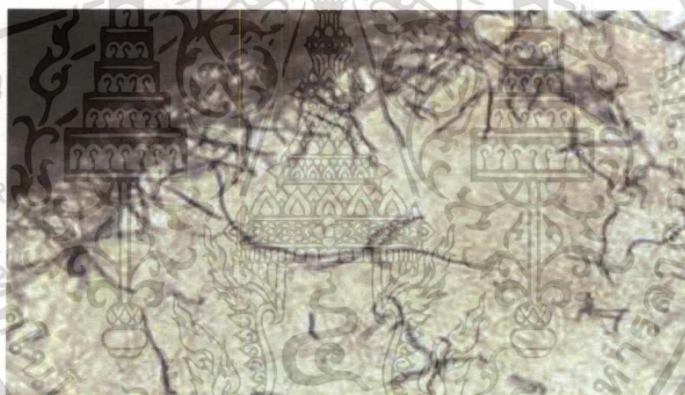
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.2 เชื้อแอสโตโมยีสท์ไฮโซเลท SM0212103 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White สร้างเส้นใยอาหารสี Light greenish brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโตโมยีสท์ไฮโซเลท SM0212103 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

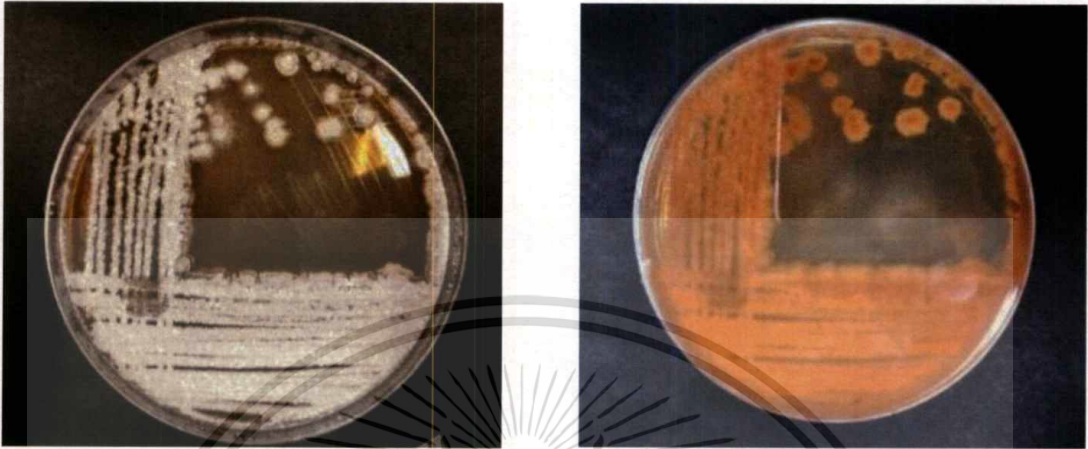
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.3 เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสปีชีส์ไอโซเลท SM1622107 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light gray สร้างเส้นใยอาหารสี Brilliant greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมสปีชีส์ไอโซเลท SM1622107 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.4 เชื้อแอสโตโมยีสท์ไอโซเลท SM1512115 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโตโมยีสท์ไอโซเลท SM1512115 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

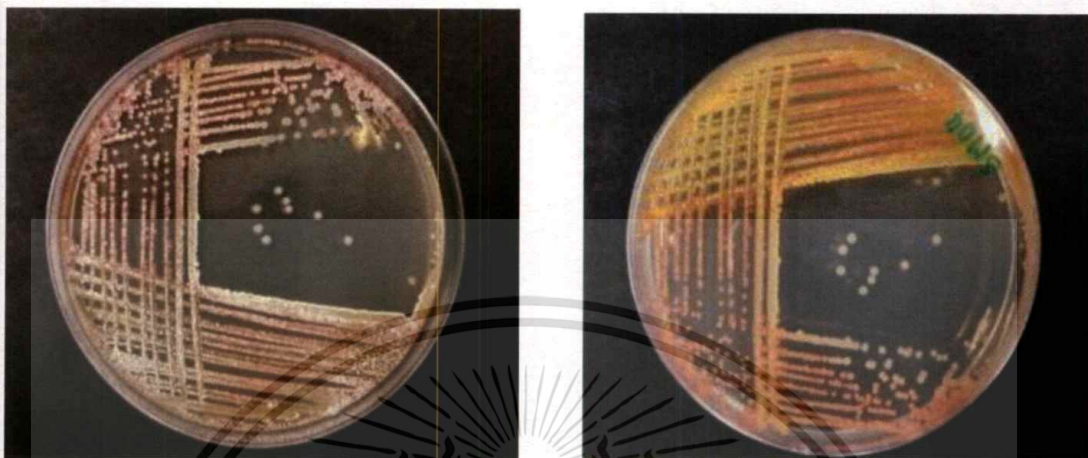
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.5 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1922104 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish gray สร้างเส้นใยอาหารสี Dark reddish orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1922104 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

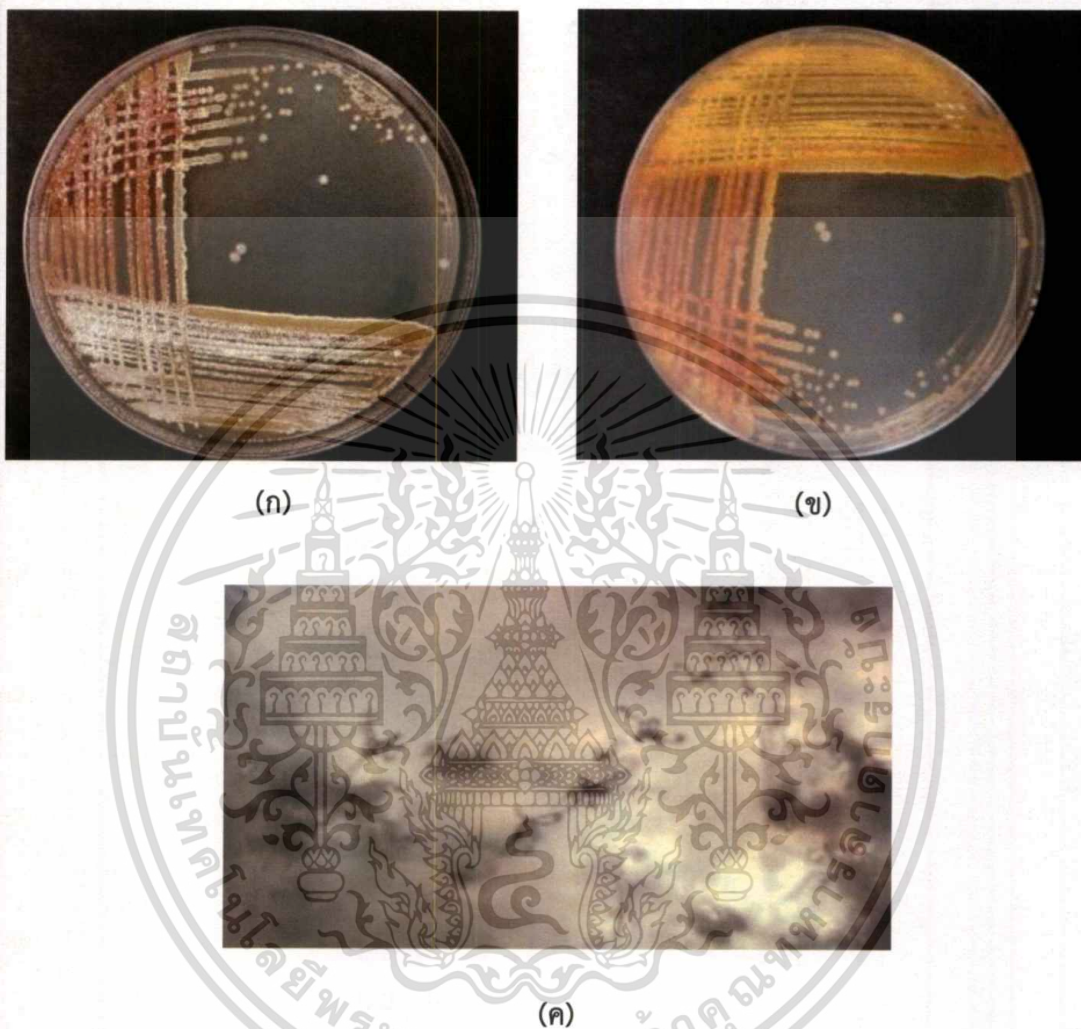
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

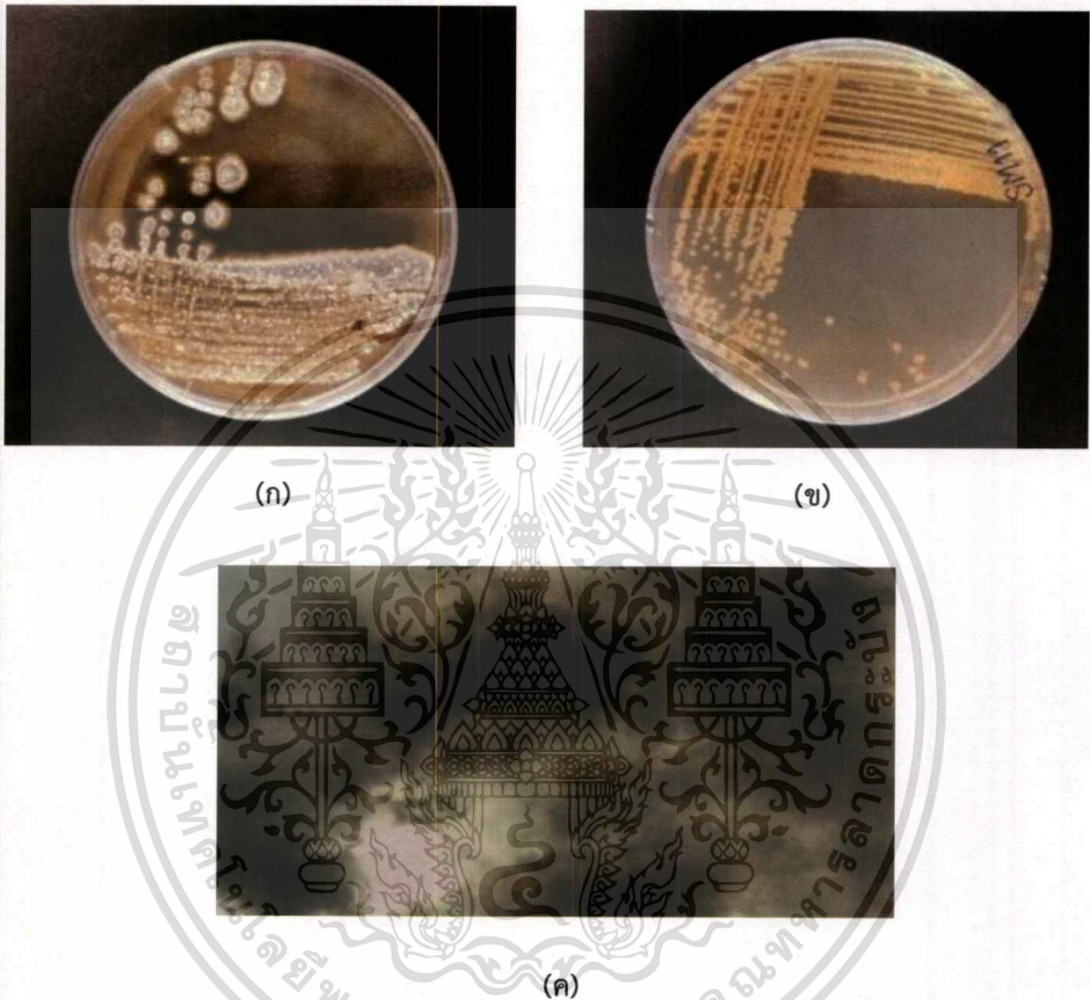
4.3.1.6 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1922206 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish gray สร้างเส้นใยอาหารสี Deep reddish orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1922206 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.7 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1712108 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish gray สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1712108 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.8 เชื้อแอสโตมัยซีทไอโซเลท SM1912109 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish white สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Light olive yellow



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโตมัยซีทไอโซเลท SM1912109 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

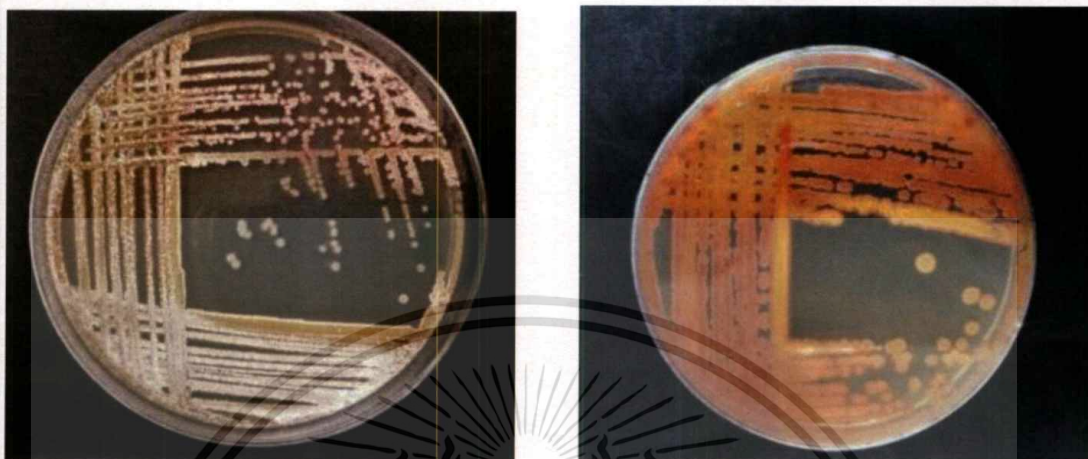
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

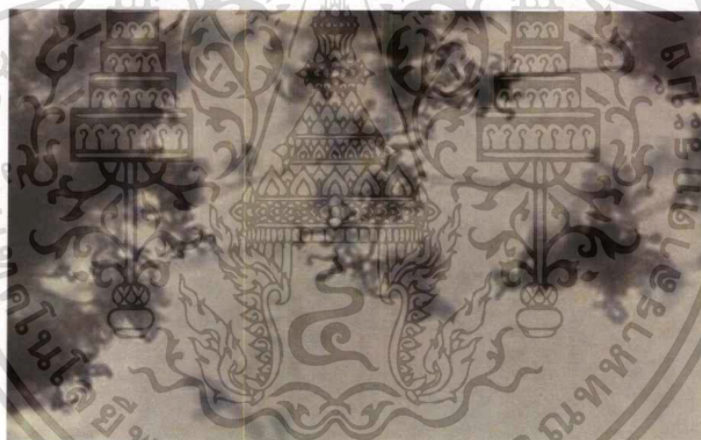
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.9 เชื้อแอสโตโมไมซีทไอโซเลท SM1912114 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish gray สร้างเส้นใยอาหารสี Dark reddish orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโตโมไมซีทไอโซเลท SM1912114 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.10 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1412112 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Very light green สร้างเส้นใยอาหารสี Light olive brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Moderate olive brown



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1412112 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

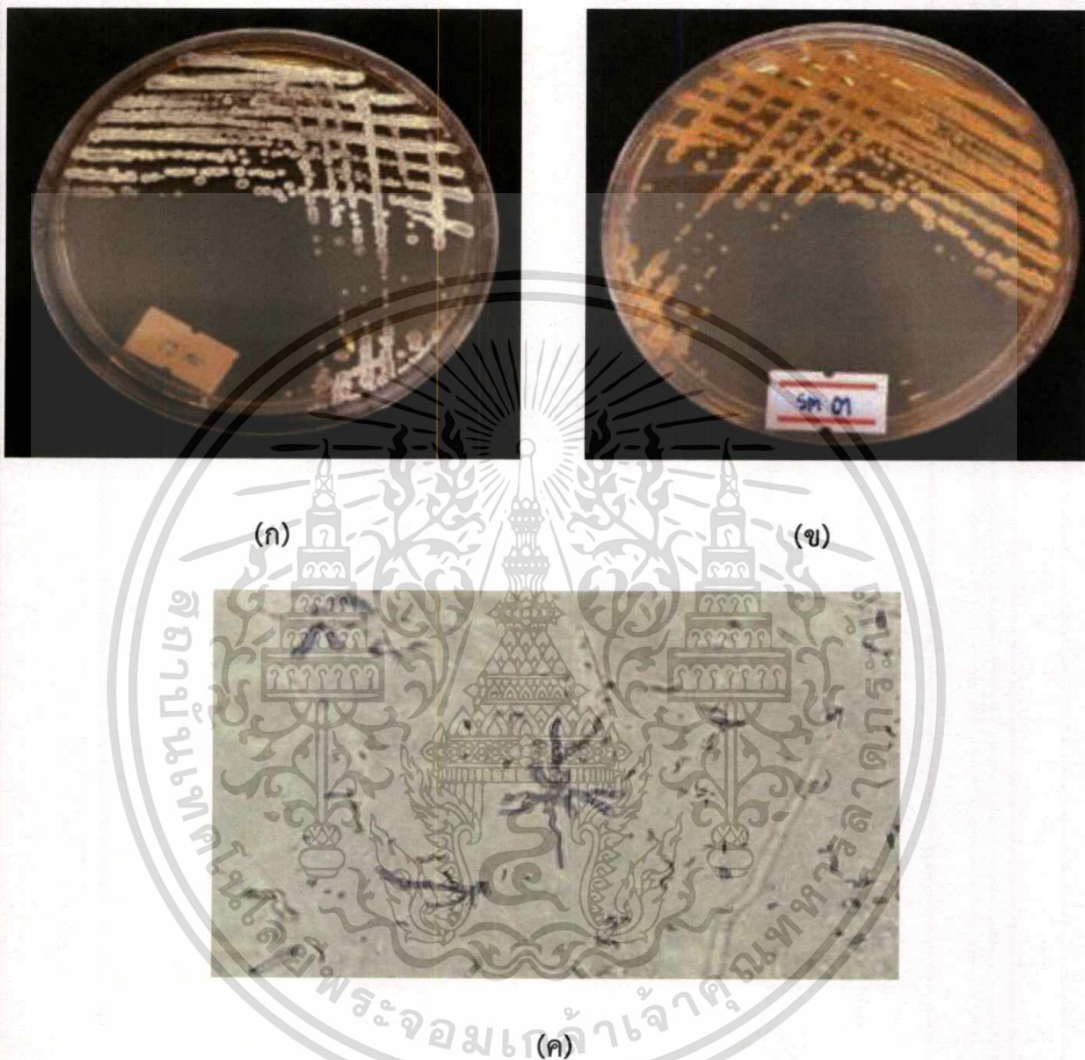
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.11 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM0711201 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Pale yellow สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM0711201 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

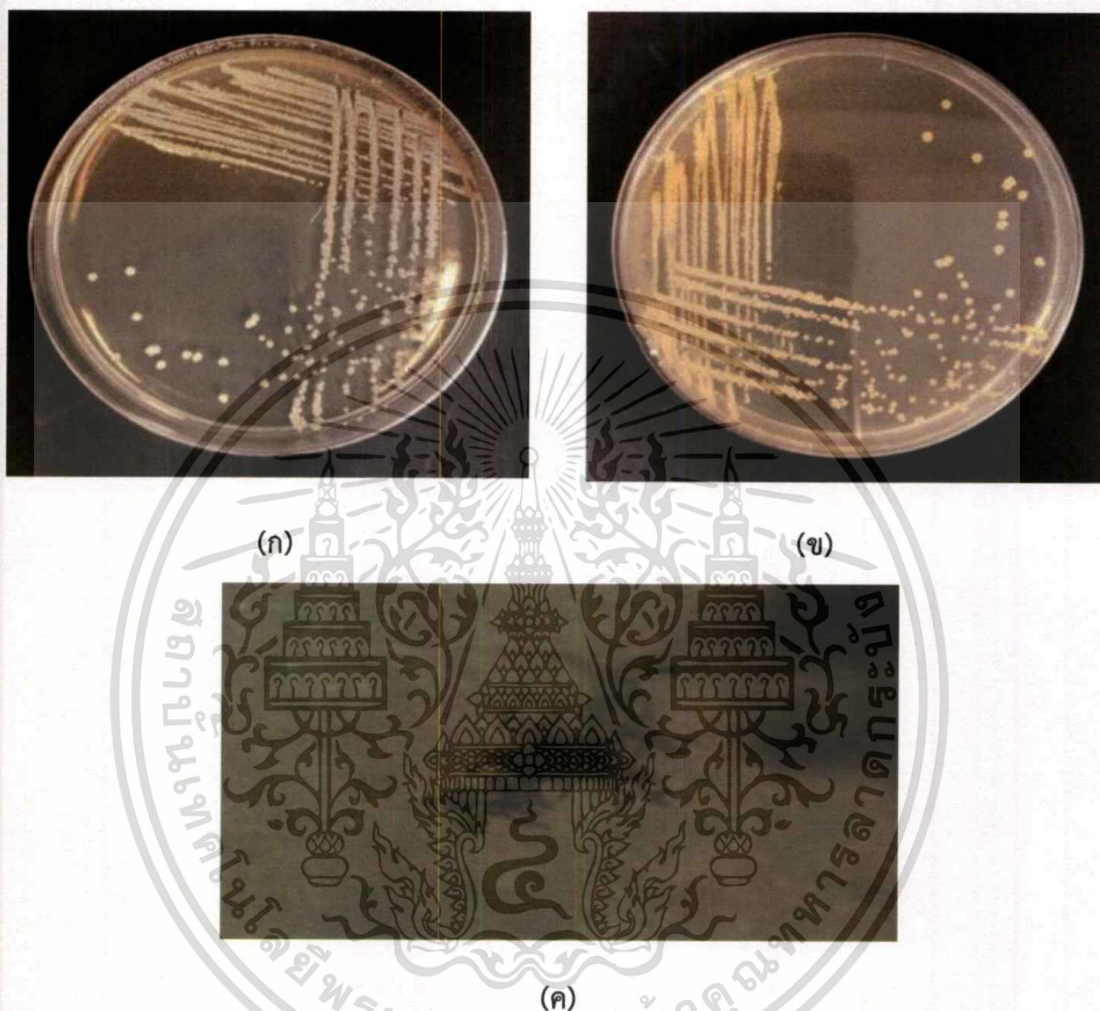
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

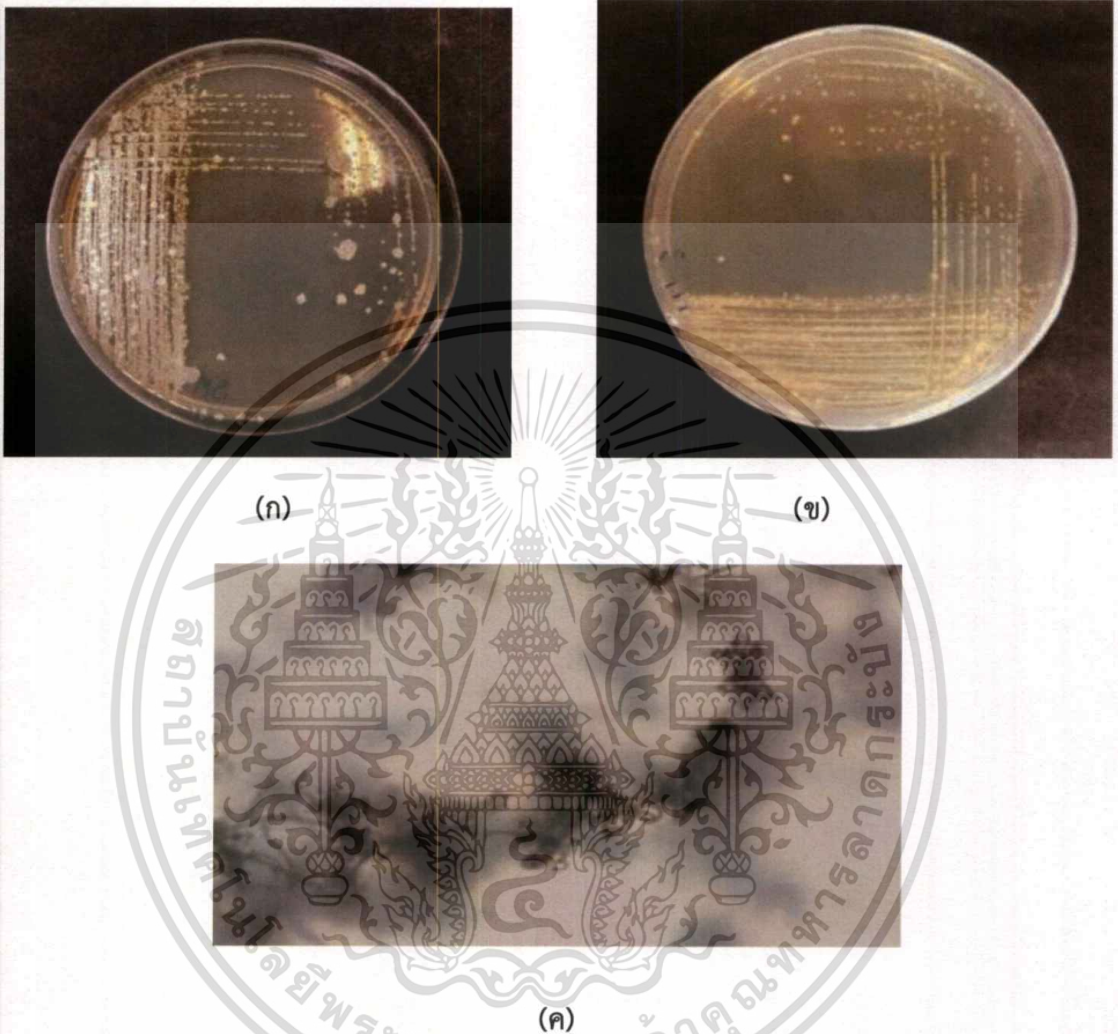
4.3.1.12 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต SM1412105 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate yellow สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต SM1412105 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

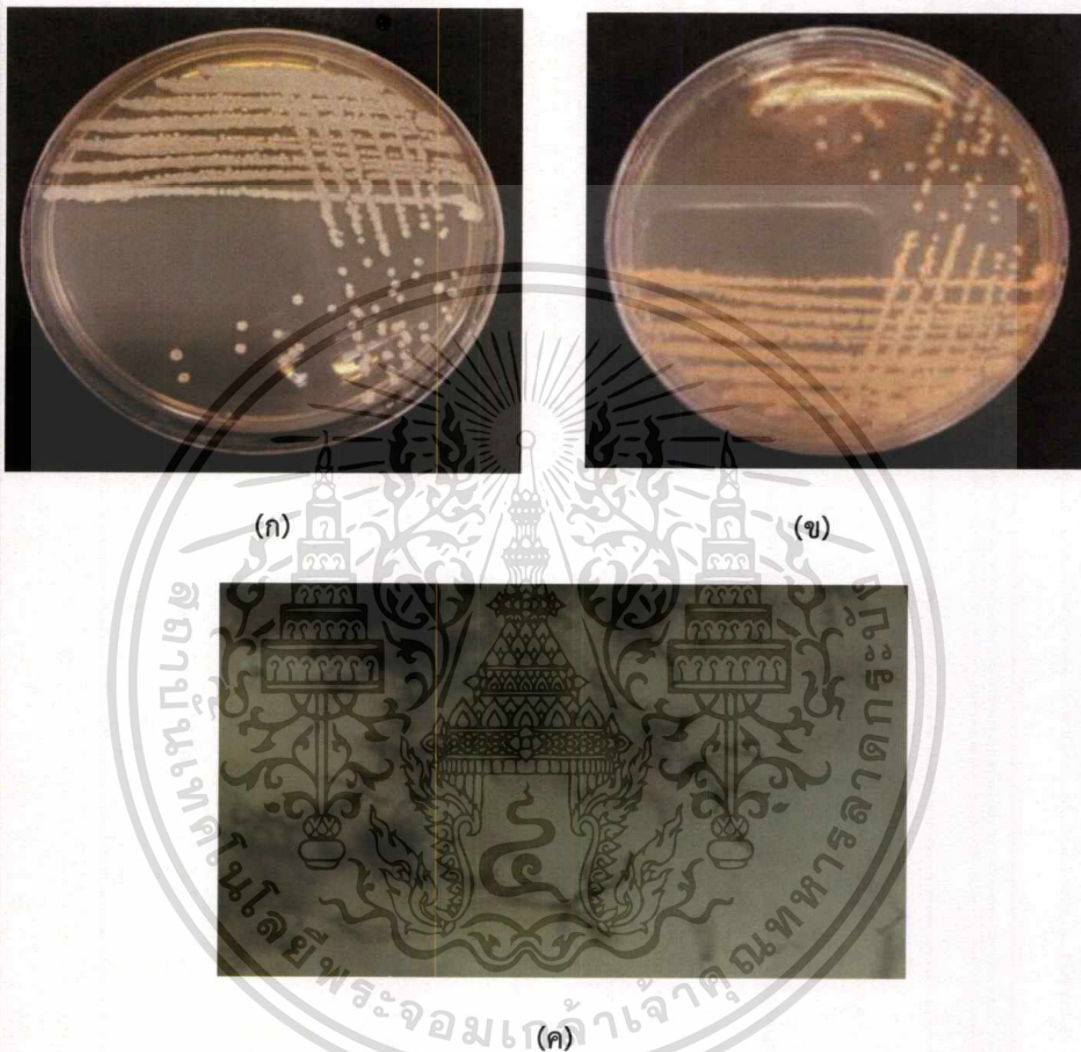
4.3.1.13 เชื้อแอสคิตินมัยสีทไอโซเลท SM1422110 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate yellow สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยสีทไอโซเลท SM1422110 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.14 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต SM1322211 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate yellow สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลต SM1322211 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

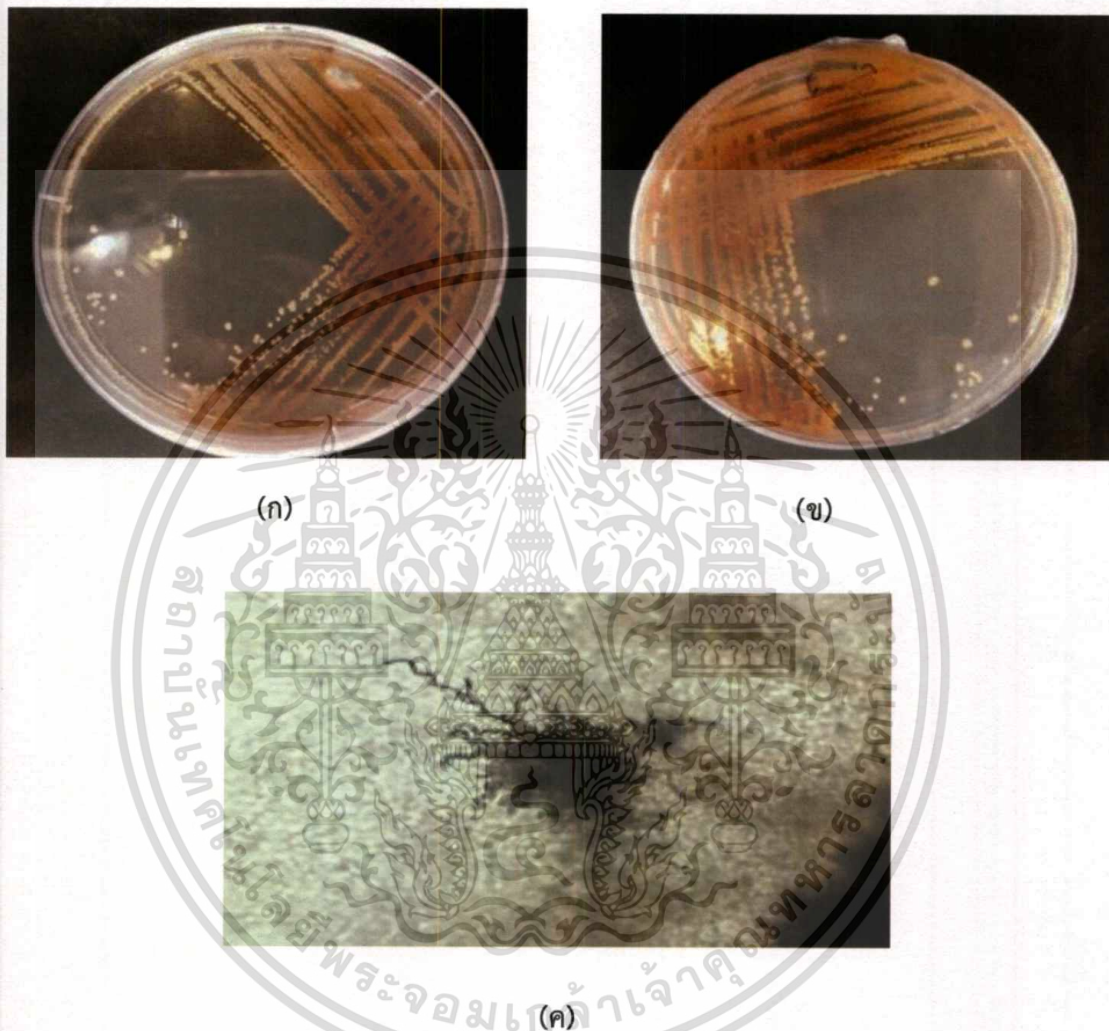
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.15 เชื้อแอสโตโมนิสไฮโอไลเท SM1712113 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish white สร้างเส้นใยอาหารสี Dark reddish orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโตโมนิสไฮโอไลเท SM1712113 บนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ long distance lens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 15 ไอโซเลท เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system)

หมายเลข ไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้
SM 0311102	Light gray	Brilliant yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 0212103	White	Light greenish brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1622107	Light gray	Brilliant greenish yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1512115	White	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1922104	Greenish gray	Dark reddish orange	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1922206	Greenish gray	Deep reddish orange	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1712108	Greenish gray	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1912109	Greenish white	Moderate yellow	Light olive yellow
SM 1912114	Greenish gray	Dark reddish orange	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1412112	Very light green	Light olive brown	Moderate olive brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคติโนมัยสีทจำนวน 15 ไอโซเลท เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system) (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้
SM 0711201	Pale yellow	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1412105	Moderate yellow	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1422110	Moderate yellow	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1322211	Moderate yellow	Moderate yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
SM 1712113	Yellowish white	Dark reddish orange	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ลักษณะทางโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ จำนวน 15 ไอโซเลท จากดินป่าชายเลน บริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี



SM1712108



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่พบจากการเก็บตัวอย่างจากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรารภรณ์ และคณะ, 2559) เมื่อสังเกตลักษณะเด่นของเชื้อแอกติโนมัยสีทเบื้องต้นจากลักษณะโคโลนี เส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) เส้นใยใต้อาหาร (Substrate mycelium) รังควัตถุ และลักษณะของสปอร์ ดังนี้

4.3.3.1 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 120 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรังควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 120 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.2 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 122 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรังควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.17

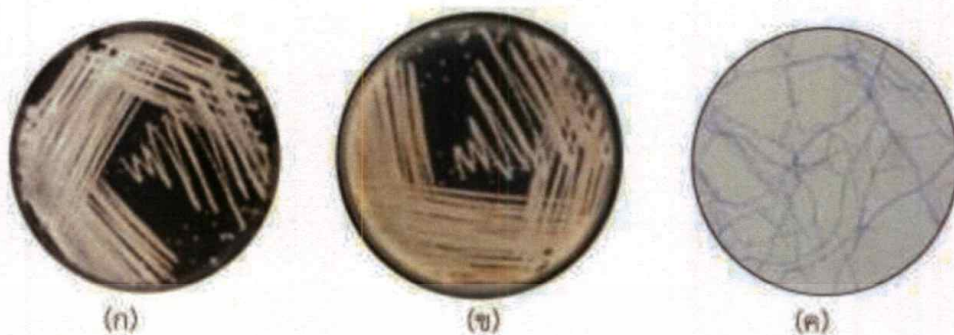


รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 122 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.3 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 220 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 220 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.4 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 520 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Yellowish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 520 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.5 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ BK 522 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท BK 522 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

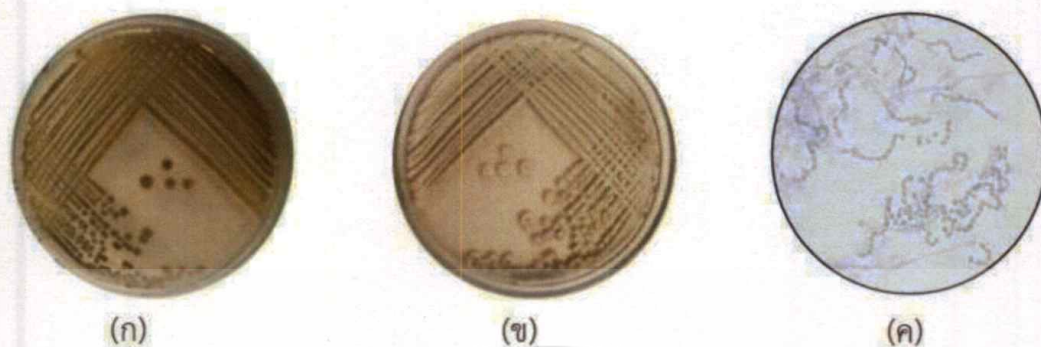
4.3.3.6 เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลทที่ BK 530 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Strong Olive Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท BK 530 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.7 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 730 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Grayish Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ดังรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 730 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

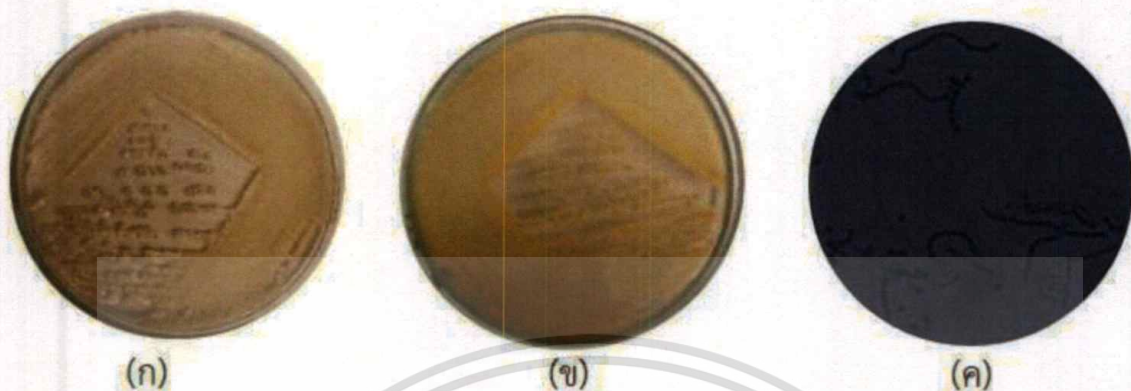
4.3.3.8 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 820 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ดังรูปที่ 4.23



รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 820 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.9 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 821 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White
เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 821 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.10 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK1020 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White
เส้นใยใต้อาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 1020 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การแต่งเนื้อหาเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.11 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 1030 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White
เส้นใยใต้อาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 1030 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.12 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 1232 สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White
เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.27



รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 1232 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.13 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 121 สร้างเส้นใยอากาศสี Light Grayish Olive เส้นใยได้อาหารสี Moderate Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 121 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

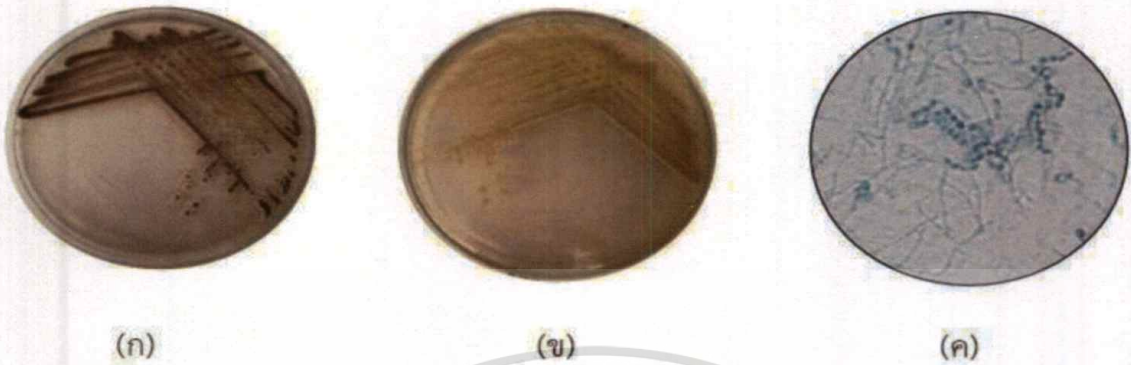
4.3.3.14 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 132 สร้างเส้นใยอากาศ Light Olive Gray เส้นใยได้อาหารสี Dark Grayish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี Pale Greenish Yellow ดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 132 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.15 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 230 สร้างเส้นใยอากาศ Light Olive Gray เส้นใยใต้อาหารสี Yellowish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 230 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

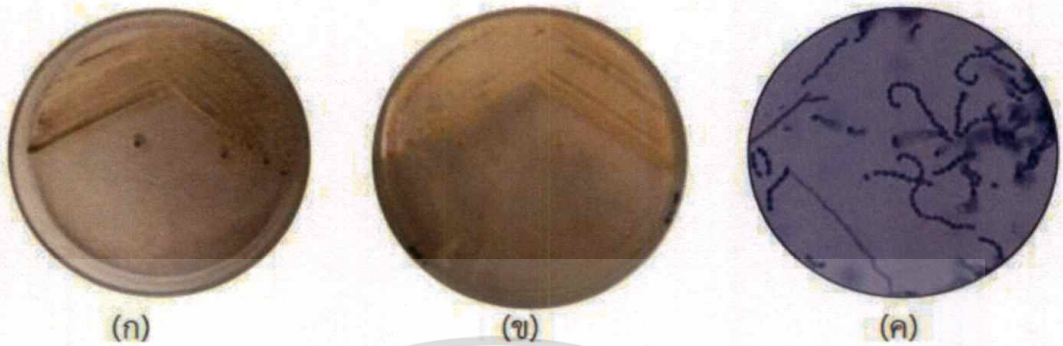
4.3.3.16 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 830 สร้างเส้นใยอากาศ Light Olive Gray เส้นใยใต้อาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.31



รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 830 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.17 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 831 สร้างเส้นใยอากาศ Light Olive Gray เส้นใยใต้อาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 831 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.18 เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 1021 สร้างเส้นใยอากาศ Light Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Grayish Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.33



รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK 1021 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.19 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 1630 สร้างเส้นใยอากาศ Light Olive Gray
เส้นใยใต้อาหารสี Yellowish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 1630 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.20 เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลทที่ BK 123 สร้างเส้นใยอากาศ Light Yellow Green
เส้นใยใต้อาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.35



รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท BK 123 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.21 เชื้อแอสโคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 232 สร้างเส้นใยอากาศ Graynish Yellow Green เส้นใยได้อาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.36



รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคติโนมัยสีทไอโซเลท BK 232 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.22 เชื้อแอสโคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 235 สร้างเส้นใยอากาศ Graynish Yellow Green เส้นใยได้อาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.37



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคติโนมัยสีทไอโซเลท BK 235 บนอาหาร SCA

- (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
- (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.23 เชื้อแอสโคดิโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 521 สร้างเส้นใยอากาศ Light Brownish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ดังรูปที่ 4.38



รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยสีทไอโซเลท BK 521 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3.3.24 เชื้อแอสโคดิโนมัยสีทไอโซเลทที่ BK 1520 สร้างเส้นใยอากาศ Light Grayish Yellowish Brown เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังรูปที่ 4.39



รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดิโนมัยสีทไอโซเลท BK 1520 บนอาหาร SCA
 (ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium)
 (ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคติโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลึง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรารักษ์ และคณะ, 2559) เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system)

หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้
BK 120	Yellowish White	Pale Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 122	Yellowish White	Light Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 220	Yellowish White	Pale Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 522	Yellowish Gray	Moderate Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 520	Yellowish Gray	Yellowish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 530	Yellowish White	Strong Olive Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 730	Yellowish White	Grayish Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 820	Yellowish White	Light Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 821	Yellowish White	Light Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1020	Yellowish White	Yellowish White	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1030	Yellowish White	Pale Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1232	Yellowish White	Light Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

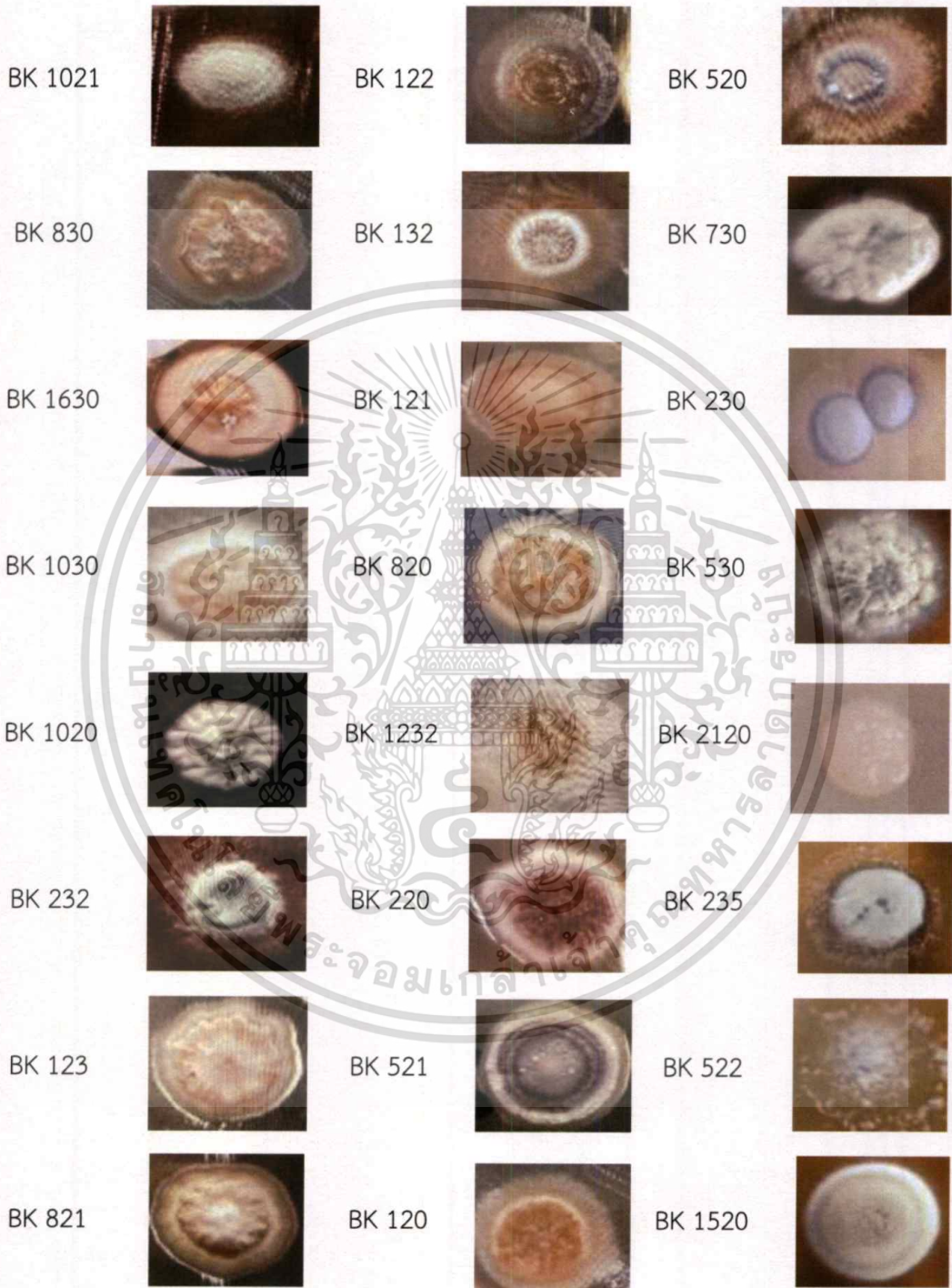
ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลึง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรารักษ์ และคณะ, 2559) เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system) (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้
BK 121	Light Grayish Olive	Moderate Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 132	Light Olive Gray	Dark Grayish Yellow	Pale Greenish Yellow
BK 230	Light Olive Gray	Yellowish Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 830	Light Olive Gray	Pale Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 831	Light Olive Gray	Light Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1021	Light Grayish Olive	Grayish Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1630	Light Olive Gray	Yellowish White	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 123	Light Yellow Green	Pale Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 232	Grayish Yellow Green	Pale Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 235	Grayish Yellow Green	Pale Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 521	Light Brownish Gray	Grayish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ
BK 1520	Light Grayish Yellowish Brown	Light Yellow Green	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ลักษณะทางโคโนลิสของแอกติโนมัยสิทที่คัดแยกได้ จำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อน ป่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีย

4.3.5.1 ในการศึกษาผลชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากดินป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จำนวน 15 ไอโซเลท (วิธีการที่ 3.6.7) มีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจำแนกและระบุคุณสมบัติของแอกติโนมัยสีย (Sharma, 2014) ทำการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยสียร้อยละ 20 ที่เกิดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนี แสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยสลายโปรตีนได้ ทำการทดสอบการย่อยสลายแป้งในอาหาร พบว่าเกิดวงใสรอบโคโลนี ร้อยละ 20 แสดงว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยสลายแป้งได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ทายาท (2558) ทำการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน พบว่าแอกติโนมัยสียร้อยละ 20 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ จากการผลิตเอนไซม์ Gelatinase ของแอกติโนมัยสีย ทำการทดสอบ oxidase และ catalase ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสียจำนวน 15 ไอโซเลท

หมายเลข ไอโซเลท	การย่อยสลาย โปรตีนในนม (Peptonization)	การย่อย สลายแป้ง	การย่อย สลายเจ ลาติน	Oxidase	Catalase
SM 0311102	+	+	+	-	-
SM 0212103	-	+	-	+	+
SM 1622107	-	+	+	-	+
SM 1512115	-	-	-	-	+
SM 1922104	-	-	-	-	+
SM 1922206	+	-	+	-	+
SM 1712108	-	-	-	-	+
SM 1912109	-	-	-	-	+
SM 1912114	-	-	-	-	+
SM 1412112	-	-	-	-	-
SM 0711201	+	-	-	-	+
SM 1412105	-	-	-	-	+
SM 1422110	-	-	-	-	+
SM 1322211	-	-	-	-	+
SM 1712113	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5.2 สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 24 ไอโซเลท (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) จากตัวอย่างมีการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 5 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar, การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis), การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction) จากการผลิตเอนไซม์ Gelatinase ของแอคติโนมัยสีท ทำการทดสอบ oxidase และ catalase ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเลขไอโซเลท	การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization)	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	Oxidase	Catalase
BK 120	-	-	-	-	-
BK 122	-	+	-	-	-
BK 220	-	-	+	+	-
BK 520	-	-	+	-	-
BK 522	-	-	+	-	+
BK 530	-	-	+	-	+
BK 730	-	-	-	-	+
BK 820	-	+	-	-	-
BK 821	-	+	+	-	-
BK 1020	-	+	+	-	+
BK 1030	+	+	-	+	+
BK 1232	+	-	-	-	-
BK 121	-	+	+	-	-
BK 132	-	+	+	-	-
BK 230	-	-	+	-	-
BK 830	-	+	-	+	-
BK 831	-	+	+	-	-
BK 1021	-	+	-	-	+
BK 1630	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 24 ไอโซเลท จากดินธารน้ำร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization)	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	Oxidase	Catalase
BK 232	-	-	+	-	+
BK 123	-	-	-	-	-
BK 235	-	-	+	-	+
BK 521	-	+	-	-	-
BK 1520	-	-	-	-	+

4.3.6 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลในอาหารเหลว Phenol red glucose ทำการตรวจผลการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร (วิธีการที่ 3.6.7.4)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล พบว่าในน้ำตาลกลูโคสพบเชื้อแอคติโนมัยซีทร้อยละ 86.67 ในน้ำตาลซูโครสร้อยละ 53.33 ในน้ำตาลไซโลสร้อยละ 80 ในน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 26.67 และในน้ำตาลแมนนิทอลร้อยละ 13.33

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้น้ำตาลทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ Glucose, Sucrose, Xylose, Lactose และ Mannitol

หมายเลขไอโซเลท	Glucose	Sucrose	Xylose	Lactose	Mannitol
SM 0311102	K/+	A/+	A/+	K/-	K/+
SM 0212103	K/+	K/+	K/+	K/-	K/+
SM 1622107	W/+	W/+	K/+	K/-	K/+
SM 1512115	A/+	W/+	A/+	W/+	W/+
SM 1922104	A/+	K/-	A/+	K/-	K/+
SM 1922206	A/+	K/-	K/-	K/-	K/+
SM 1712108	W/+	A/+	A/-	A/+	K/+
SM 1912109	A/+	W/+	A/-	K/-	K/-
SM 1912114	A/+	W/+	A/-	W/-	K/+
SM 1412112	A/+	A/+	A/-	K/-	K/+

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ หักสิทธิ์ทั้งหมดที่มีให้โดยไม่มีเงื่อนไขและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีหน้าไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยใช้ น้ำตาลทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ Glucose, Sucrose, Xylose, Lactose และ Mannitol (ต่อ)

หมายเลขไอโซ เลข	Glucose	Sucrose	Xylose	Lactose	Mannitol
SM 0711201	A/+	A/-	A/+	K/-	K/+
SM 1412105	A/+	A/+	A/-	K/-	K/+
SM 1422110	A/+	W/-	A/+	K/-	K/-
SM 1322211	A/-	A/+	A/+	W/+	W/+
SM 1712113	A/+	K/-	A/+	K/-	K/+

***หมายเหตุ : A คือ Acid = เกิดการหมักน้ำตาลมีการเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง
K คือ Alkaline = ไม่เกิดการหมักน้ำตาล
W คือ Weakly = เกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อยมีการเปลี่ยนสีอาหารจาก
สีแดงเป็นสีส้ม
+ = เกิดการสร้างแก๊ส
- = ไม่เกิดการสร้างแก๊ส

4.4 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Preliminary test)

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ 15 ไอโซเลข ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยวิธีทดสอบขั้นต้น (วิธีการที่ 3.6.8) จากการทดสอบพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท 6 ไอโซเลข ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลข

ประกอบด้วย SM0911201 และ SM1622107 ารศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย SM0711201, SM1622107, SM1912109 และ SM1712113

3. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย SM0711201 และ SM1912109

4. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย SM0711201 และ SM1712113

5. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย SM1622107 และ SM1912109

มีเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากธารน้ำพุร้อนบ่อคลิง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ดังนี้

1. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BK121 และ BK1232

2. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BK121 และ BK1232

3. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BK121 และ BK1232

4. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BK121 และ BK1232

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามี 4 ไอโซเลท จากแหล่งป่าชายเลนที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ได้แก่ ไอโซเลท SM0711201, SM1622107, SM1912109 และ SM1712113 และพบว่ามี 2 ไอโซเลท จากแหล่งธารน้ำพุร้อนที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ได้แก่ ไอโซเลท BK121 และ BK 1232 โดยผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบและไม่มีการยับยั้งยีสต์และเชื้อแอกติโนมัยสีทจากแหล่งป่าชายเลนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมากกว่าจากแหล่งธารน้ำพุร้อน

ตารางที่ 4.8 ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีที่สามารผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)												
ไอโซเลท	<i>C.albicans</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>K. rhizophila</i>	
	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา
SM 0711201	-	-	-	-	12.37	-	9.46	-	24.60	21.58	-	21.38
SM 0311102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 0212103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1922104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1412105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1922206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1622107	-	-	11.14	22.23	11.23	10.43	-	-	-	-	26.86	-
SM 1712108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1912109	-	-	25.50	32.91	-	-	-	-	11.51	12.82	11.06	-
SM 1422110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1322211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1412112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1712113	-	-	-	-	-	-	15.47	5.59	-	-	21.68	-
SM 1912114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM 1512115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

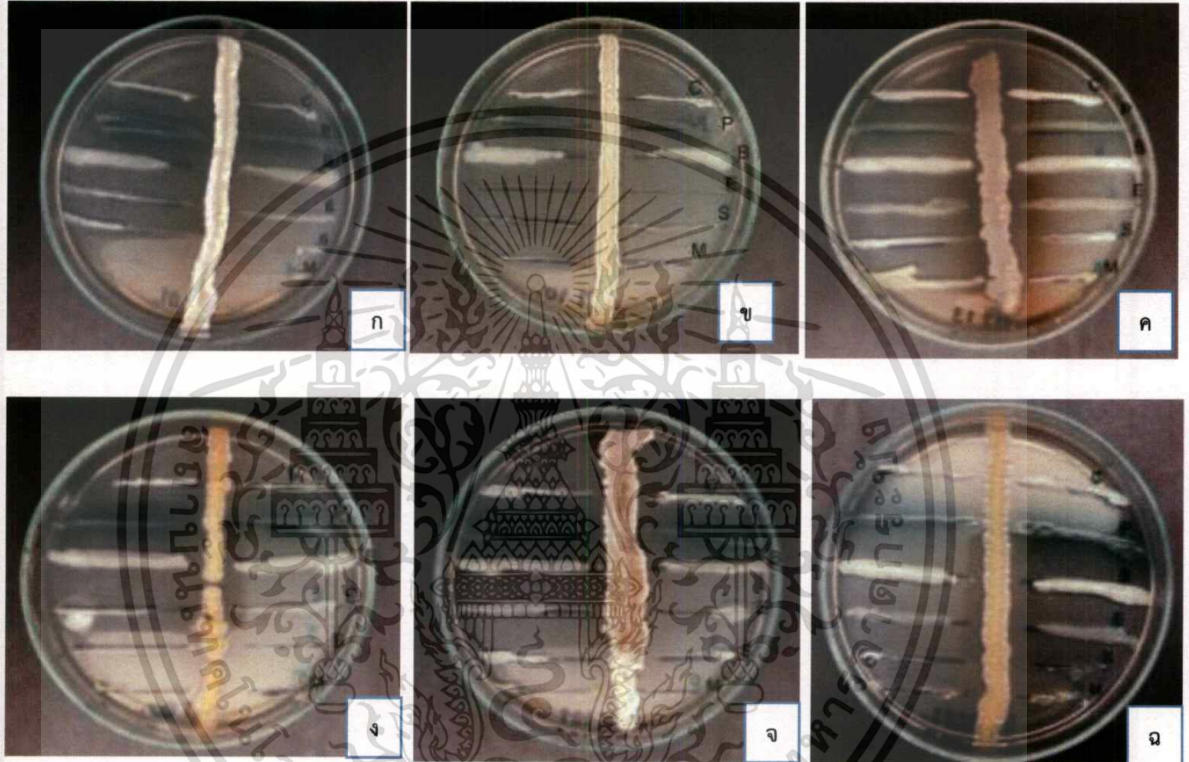
ตารางที่ 4.9 ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรนำพุร้อนบ่อคลึง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559)

บริเวณยั้ง (มิลลิเมตร)												
ไอโซเลท	<i>C.albicans</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>K. rhizophila</i>	
	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา
BK120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK121	-	-	-	-	6.10	5.18	16.23	18.97	17.46	20.28	26.15	-
BK122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK2120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.9 ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธารน้ำพุร้อนบ่อคลิง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรารักษ์ และคณะ, 2559) (ต่อ)

ไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)											
	<i>C.albicans</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>K. rhizophila</i>	
	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย	ขวา
BK730	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK821	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK830	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK1232	-	-	-	-	7.64	7.23	9.34	8.51	30.42	30.57	27.81	22.69
BK1630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK 530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทดสอบ ทั้ง 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยวิธี Modified Cross-Streak Method (วิธีการที่ 3.6.8) ของเชื้อแอกติโนไมซีททั้ง 6 ไอโซเลท เกิดระยะยับยั้ง ได้แก่ SM0711201, SM1622107, SM1912109, SM1712113, BK121 และ BK1232



รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีทในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพต่อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด

- ก. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท SM0711201 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
- ข. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท SM1622107 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
- ค. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท SM1912109 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
- ง. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท SM1712113 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
- จ. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท BK121 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
- ฉ. แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท BK1232 ที่เกิดระยะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบกิจกรรมด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

นำเชื้อแอสคิโนมัยซิสทั้ง 6 ไอโซเลทที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอสคิโนมัยซิสที่ได้จากบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และจากธารน้ำพุร้อนบ่อคลิ้ง ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) มาทำการทดสอบการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย เทคนิค Agar disc diffusion โดยใช้ทำการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตต และสกัดน้ำหมักจากเซลล์และเส้นใยด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิค agar disc diffusion โดยการนำสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงไปบนแผ่น disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำมาวางบนผิวหน้า อาหาร MHA (Muller Hinton agar) สำหรับแบคทีเรีย และบนผิวหน้าอาหาร SDA (Sabouraud dextrose agar) สำหรับยีสต์ ที่มีการ swab จุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ไว้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 ดังนี้

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจากสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตและจากตัวเซลล์ในชั้นของเมทานอล ที่ความเข้มข้น 50 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ซึ่งไม่เกิดวงใส (clear zone) บนอาหาร MHA (Muller Hinton agar) สำหรับแบคทีเรีย และบนผิวหน้าอาหาร SDA (Sabouraud dextrose agar) สำหรับยีสต์ เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ โดยความมีขั้วของเอทิลอะซิเตตและเมทานอลในการสกัดอาจมีความไม่เหมาะสม ซึ่งจากรายงานการวิจัยของสุทธินัน (2551) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซิสไอโซเลท CMU-PA101 ในอาหารเหลวมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ Thexane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform และ butanol พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ butanol สามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ทั้งนี้อาจจะขึ้นอยู่กับเชื้อทดสอบและสารสกัดซึ่งแต่ละไอโซเลทจะเหมาะกับตัวทำละลายที่แตกต่างกันจึงจะให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุดที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของเชื้อแอสคิโนมัยซิสอีกด้วย

จากรายงานการวิจัย Minas en ในส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแอสคิโนมัยซิสรวมถึงการลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารหยาบได้น้อยลงซึ่งก่อนที่จะสกัดสารหยาบต้องนำน้ำหมักทำแห้งก่อนเนื่องจากง่ายต่อการสกัดและได้สารที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ขอสงวนสิทธิ์ในการค้าทั้งหมดโดยทั่วไปแล้วนั้นแอสคิโนมัยซิสเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายซึ่งการเลี้ยงในระดับการไม่ผ่านการใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงขนาดเล็กลงจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้แต่การเลี้ยงในระดับนี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการได้ (Minas en. 2000)

4.6 การตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

จากการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทโดยใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการโดยใช้เชื้อแอกติโนมัยซีทที่สนใจจากดินป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ SM1322211, SM1422110, SM1712113 และ SM0212103 และใช้เชื้อแอกติโนมัยซีทจากบริเวณธารน้ำร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BK830, BK1030 และ BK530 ทั้งหมดจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16s ribosomal RNA gene (ดังรูปที่ 4.41) และวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท U2Bio จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยโปรแกรม EZBioCloud



รูปที่ 4.41 แสดงภาพ Gel electrophoresis ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BK530 (1), ไอโซเลท BK830 (2), ไอโซเลท SM1322211 (3), ไอโซเลท SM0212103 (4), ไอโซเลท SM1712113 (5), ไอโซเลท SM1422110 และ BK1030 (7) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิราวุธวิทยาลัย โดยขอสงวนสิทธิ์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ของแบคทีเรียบริเวณ 16S ribosomal RNA gene วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท U2Bio จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยโปรแกรม EzBioCloud พบว่า ความคล้ายคลึงกับแอกติโนมัยซีทในสายพันธุ์ต่างๆ ดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.42-4.55

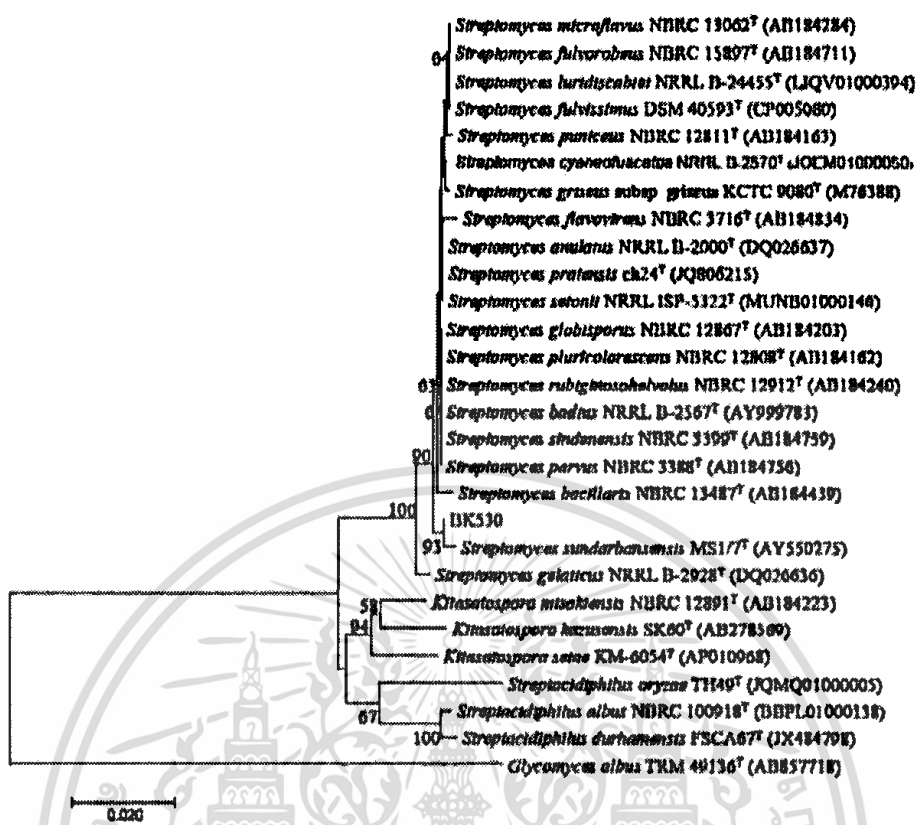
ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนมัยซีท

ไอโซเลท	Sequence tested isolates	GenBank accession No.	Similarity (%)
BK530	<i>Streptomyces sundarbansensis</i>	MS1/7	99.79
BK830	<i>Streptomyces griseorubens</i>	NBRC 12780	99.72
SM1322211	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	LMG 19316	98.64
SM0212103	<i>Streptomyces coeruleus</i>	ISP 5146	97.38
SM1712113	<i>Streptomyces rochei</i>	NRRL B-2410	100
SM1422110	<i>Streptomyces hyderabadensis</i>	OU-40	99.38
BK1030	<i>Streptomyces griseoruber</i>	NRRL B-1818	98.68

>BK530

GCTGGATCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
 GAAATCACTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTG
 GAAACGGGGTCTAATACCGGATACCACTTTGTCCCGCATGGGACGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCCG
 GGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
 CGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGCAGGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAA
 AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC
 TCGTAGGGGCTTGTACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGT
 GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTC
 TGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACGATTAGATACCTGGTGTCCACGCGCTAAACGTT
 GGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGC
 AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGA
 CTTACCAAGGCTTGACATATACGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCTTGTGGTCCGATACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGG
 TGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCT
 TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCA
 GTTCGGATTGGGGTCTGCAACTGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGT
 TCCCGGCCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGG
 GAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATTACCT
 C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 รูปที่ 4.42 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BK530 ขนาด 1,537 bp



รูปที่ 4.43 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BK530

>Bk830

CCTGGTTACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
 GAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
 AACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCCGCTTGGGCATCCAAGCGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGG
 CCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGG
 GACTGAGACAGCGCCAGCTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG
 CCGCTGAGGGATGCCAGCCCTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACTGCAAGAGAA
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAGCGCTTGTCCGGAATATTGGGCGTAAAAGACTC
 GTAGGCGGCTTGTACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGCTGTCAGTGCATACGGGCGAGCTAGAGTTCGG
 TAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTG
 GGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGGTAACCGTG
 GGCAGTGGTGTGGGCGACATCCACGTCGTCCTGCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTAATTTCAGCGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGT
 GCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTT
 GGGCTGCACAGTGTACAATGGCCGTTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG
 TTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTGCCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCAGTACGAAAGTCAGTAACCGCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGG
 AGCTGTCAAAGT

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี หากมีการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ขออนุญาต
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

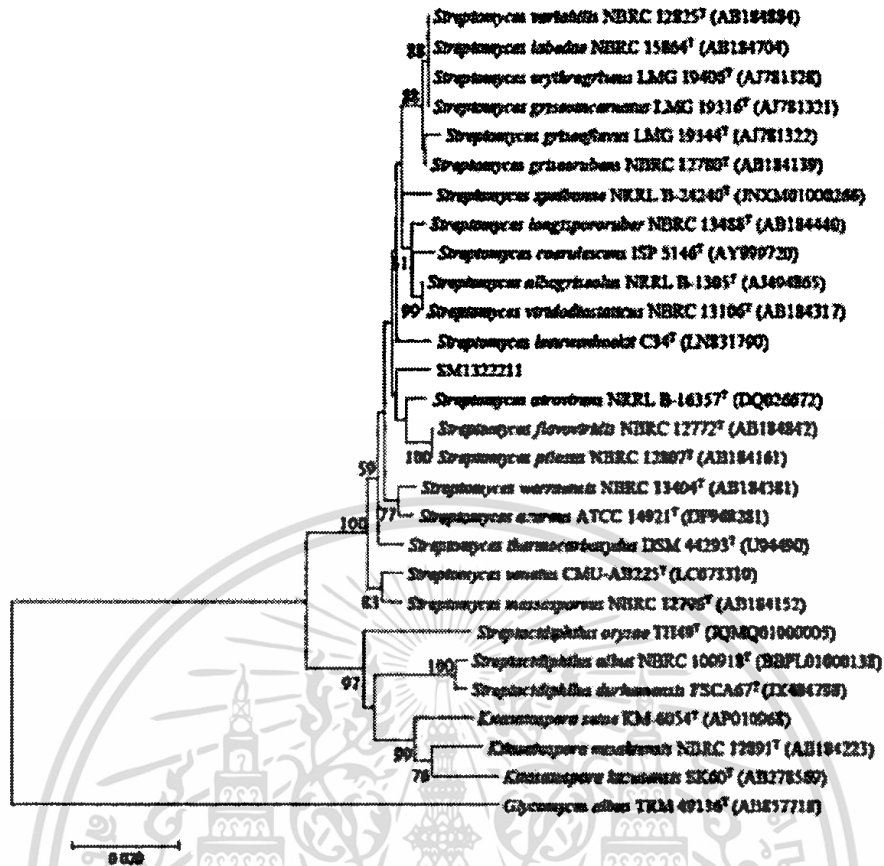


รูปที่ 4.45 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท BK830

>SM1322211

CCTTAGCTGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAACGATGAACCTCCTTCG
 GGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTC
 TAATACCGGATACTGACCCGCTTGGGCATCCAAGCGGTTGCAAAGCTCCGGCGGTGAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGC
 TTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAG
 GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC
 TTGTCGCGTGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGCTCGAGTCGATACGGGCGAGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
 ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAG
 GTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGAGTACGCCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATACCCGAAACGCTGGAGACAGGCGCCCCCTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTGTGGTGGTGGGG
 ACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGAGCAGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTGC
 ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAACAGCCGGTCTCAGTTCGGAT
 TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACCTTCGGGAA
 CTTGTACGCACCGCCCGTGACGTCACGAAAGTCGGTAACACCGAAGCCGGTGGCCC

รูปที่ 4.46 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท SM1322211 ขนาด
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 1,427 bp
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



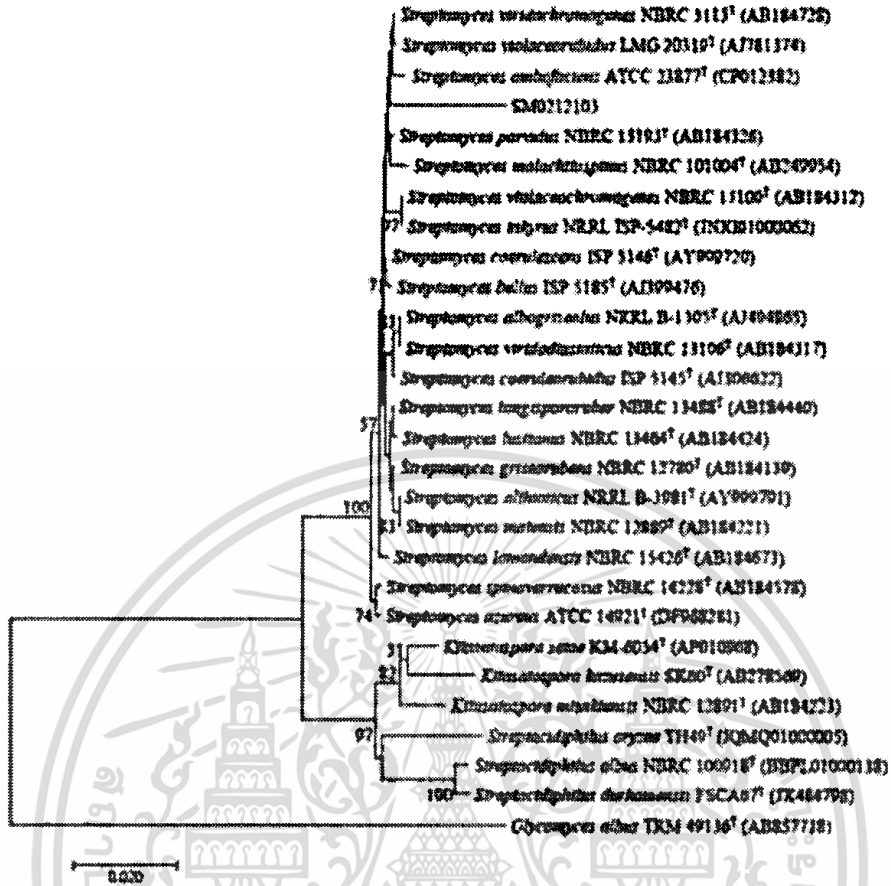
รูปที่ 4.47 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท SM1322211

>SM0212103

```
CCTGGCTCACCTCCTTAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
GAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGGTCTAATACCGGATACTGAGCTACTGGGCATCCAAGTGGTTGCAAAGCTCCGCGGTGAGGATGAGCCCGCGG
CCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG
CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA
GCGCCGGTAACACTAGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGG
TAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTG
GGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTG
GGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCGACGCGAAGAACC
TTACCAGGGCTTGACATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCGCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGTCTGTC
GTTATCTCGAGTCATGATATGGTGAGTTAAGTCTGAAACGAGCGCAACCCTTGTACGTGATGCCAACAGACCTTGTGGT
GCTGGAA
```

รูปที่ 4.48 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท SM0212103 ขนาด 1,137 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



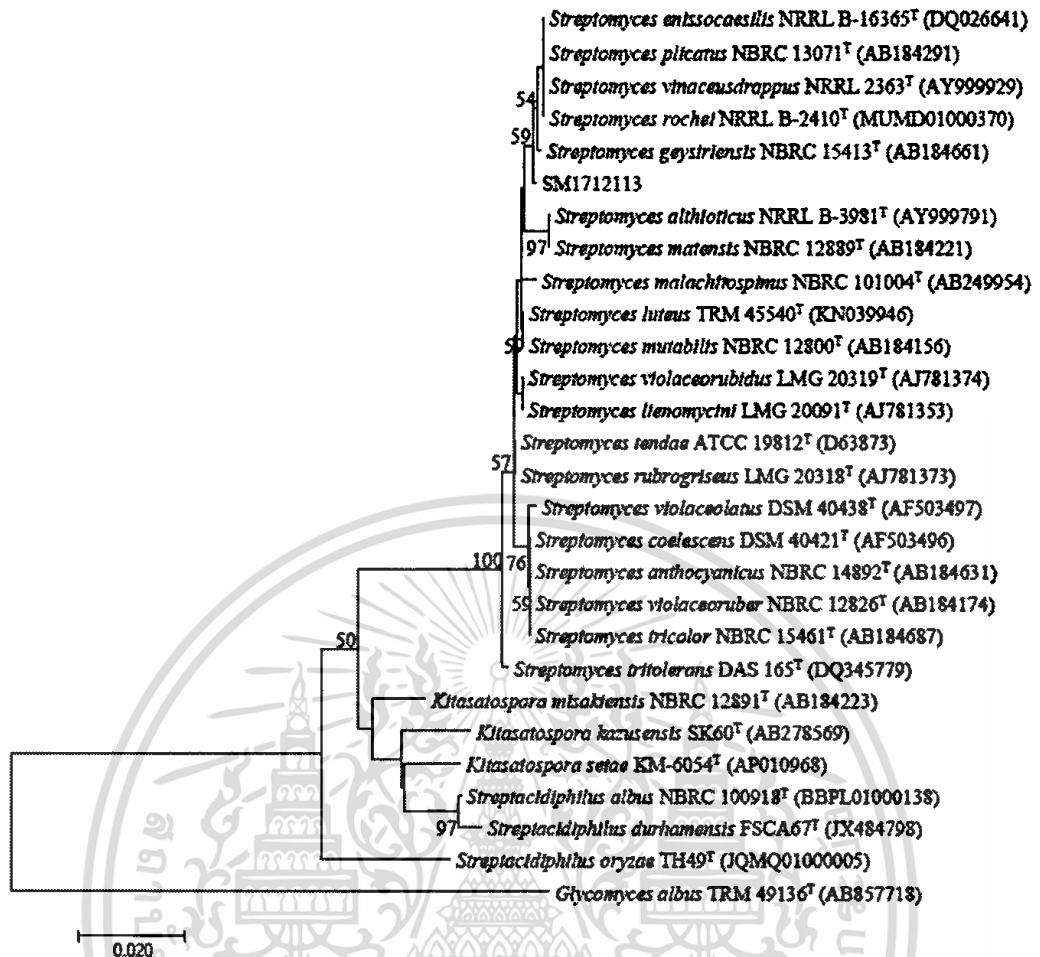
รูปที่ 4.49 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสปีทไอโซเลท SM0212103

>SM1712113

CGGGTCCCCCGGGGAATTCCTTGAATTTTGGCCCTGCGGCCAAATTCCCCCAGATGGGGCAGATACATCCGGTTGG
 GTGCGGCGGGCAACGGTGAATTTTGGCCCCACGTAGTGGCCCCGTTTACGGCGTGCGTGAGTATGATCTTGGCTCA
 GGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA
 GTAACACGTGGGCAATCTGCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGC
 ATCTGCGAGGTTGCAAAGCTCCGGCGGTGACGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
 GCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAG
 CAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACC
 TCTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCGAAGAAGCGCCGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGCTTGTACGTGGTTGTGAAAGCCCGG
 GGCTTAACCCCGGCTGCGAGTCGATACGGGACGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGGCGGATCT

รูปที่ 4.50 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสปีทไอโซเลท SM1712113 ขนาด 849 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



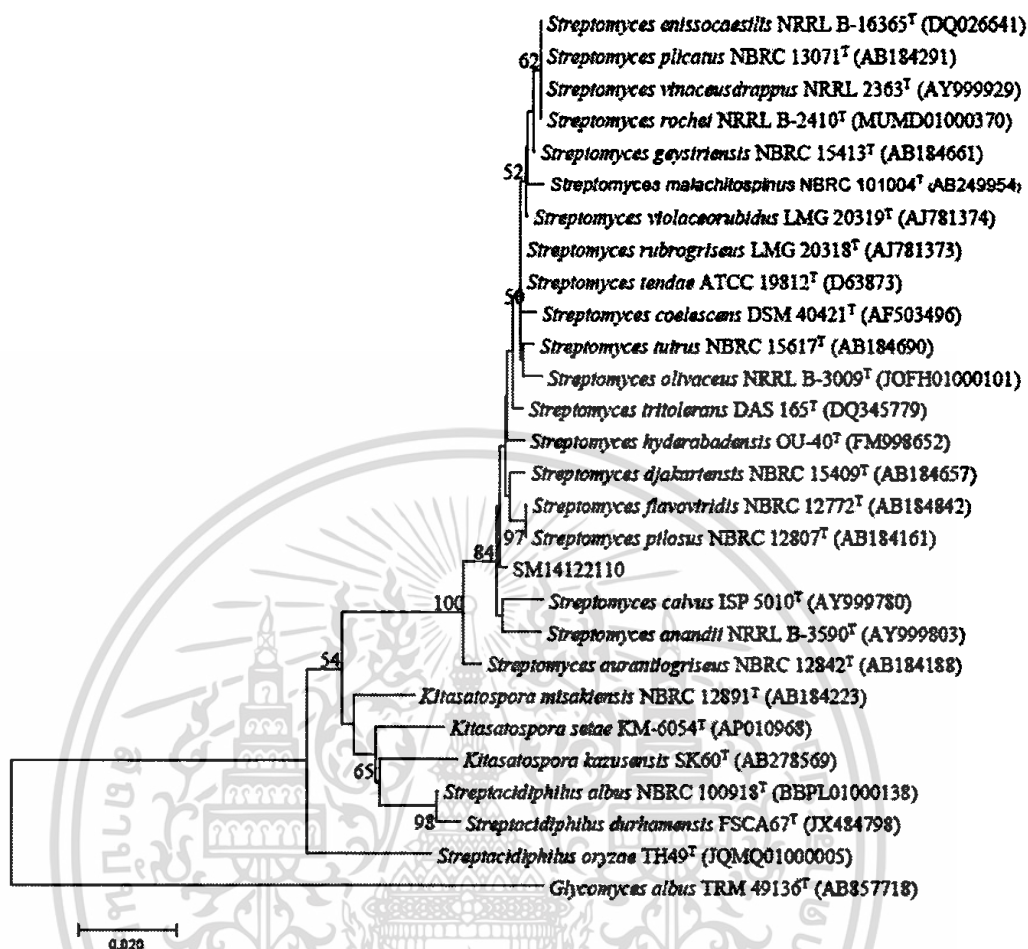
รูปที่ 4.51 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1712113

>SM1422110

CGGCCTGGACTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTT
 CGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACCGGGT
 CTAATACCGGATATGACCCTCGCAGGCATCTGTGAGGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGC
 TTGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGCAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAG
 GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT
 AACTAGTGCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGGC
 TTGTCGCGTCCGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
 ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGGCGG

รูปที่ 4.52 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1422110 ขนาด 709 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



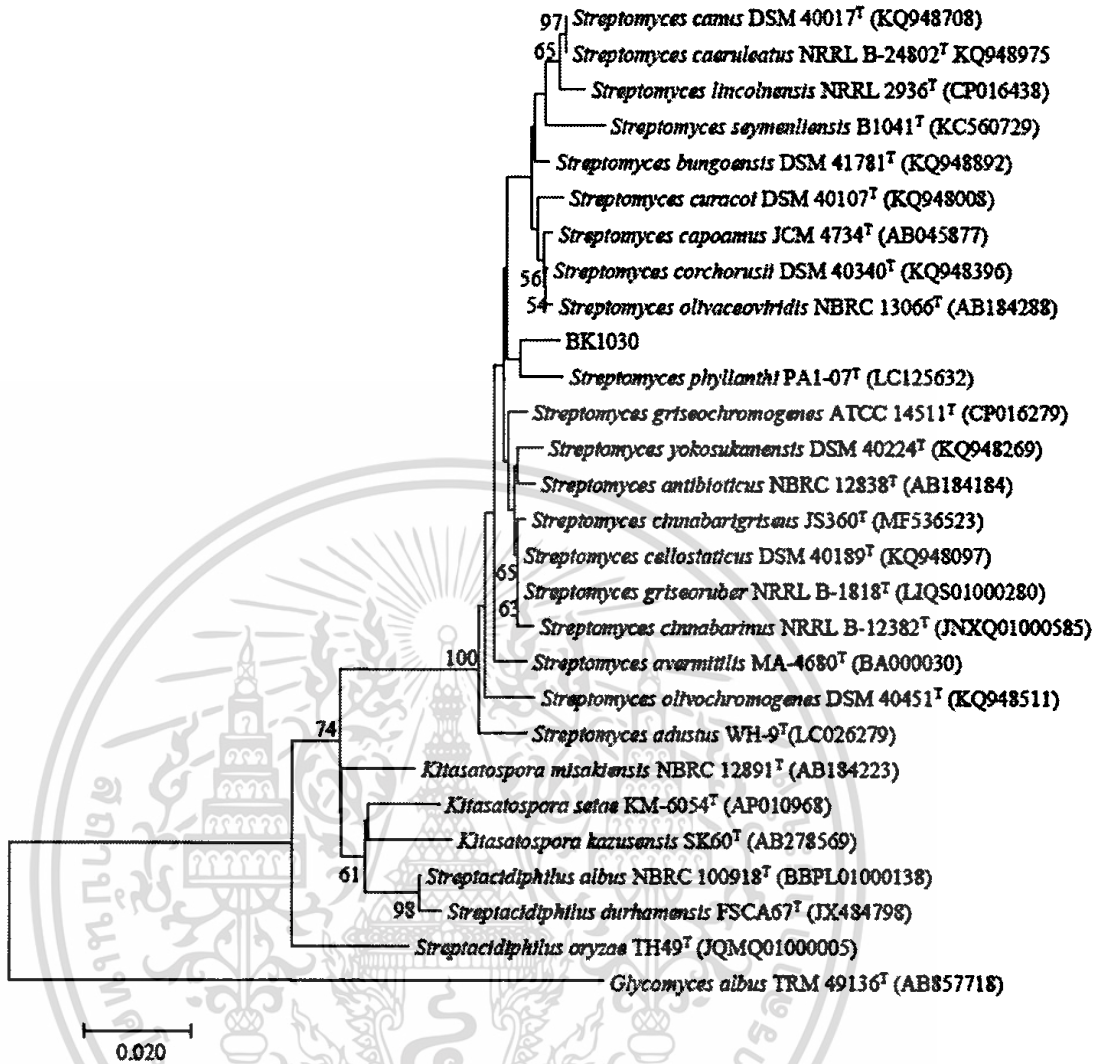
รูปที่ 4.53 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท SM1422110

>BK1030

TGCCACACCTGTGCCCCCGTTTACGGCCTGAATTGAGTGTGATCTTGGTTTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTCGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATTTGCCCTTCACT
 TTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGTCTAATACGGATACCACTCTCACGGGCATCTGTGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTG
 AAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGG
 CGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
 GCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTCGGGTTGTAACTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGAC
 GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGGAATTAT
 TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGCTTGTACGTGGGTGTAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTGATAACGG
 GCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGA

รูปที่ 4.54 ลำดับเบสบริเวณ 16s rRNA gene เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK1030 ขนาด 737 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.55 แสดงแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1000 replicates ของแอกติโนมัยสีทไอโซเลท BK1030

ในการศึกษาผลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทเพื่อทำการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยใช้ 16s rRNA และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ โดยใช้เชื้อแอกติโนมัยสีทที่สนใจจากดินป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ SM1322211, SM1422110, SM1712113 และ SM0212103 และใช้เชื้อแอกติโนมัยสีทจากบริเวณธารน้ำร้อนตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BK830, BK1030 และ BK530 ทั้งหมดจำนวน 7 ไอโซเลทพบว่า ไอโซเลท BK530 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sundarbansensis* 99.79% (ดังรูปที่ 4.43 และ 4.44) ไอโซเลท BK830 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseorubens* 99.72% (ดังรูปที่ 4.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าและ 4.46) ไอโซเลท SM1322211 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

griseoincarnatus 98.64% (ตั้งรูปที่ 4.47 และ 4.48) ไอโซเลท SM0212103 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces coerulescens* 97.38% (ตั้งรูปที่ 4.49 และ 4.50) ไอโซเลท SM1712113 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces rochei* 100% (ตั้งรูปที่ 4.51 และ 4.52) ไอโซเลท SM14122110 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces hyderabadensis* 99.38% (ตั้งรูปที่ 4.53 และ 4.54) และไอโซเลท BK1030 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseoruber* 96.68% (ตั้งรูปที่ 4.55 และ 4.56)

จากงานวิจัยของ Robert และคณะ รายงานว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่อยู่ที่ 97.0%–99.5% (Keswani, 2001) และค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ Robert และคณะได้กล่าวว่าการหาแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่ ค่าร้อยละความคล้ายคลึงอยู่ที่ 98.7%–99.0% โดยในโครงการนี้พบว่าไอโซเลท SM1322211, SM0212103 และ BK1030 คาดว่าน่าจะมีแนวโน้มเป็นแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ เนื่องจากว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่น่าจะเป็นแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่อยู่ในช่วง 98.7%–99.0% ตามรายงานข้างต้น (Robert, 2012) (ดังตารางที่ 4.10)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทจากดินบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี พบว่า สามารถแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0-7.2 มีค่าน้ำหนักสารแขวนลอยเฉลี่ยของดินอยู่ที่ 1.481 กรัม ความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 45.21 ในการคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทมี 10 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร Starch casein agar (SCA) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 5 ไอโซเลท เจริญบนอาหาร Zhang's Starch Soil Extract agar (ZSSE) ที่อุณหภูมิ 30 องศา เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทบนอาหาร International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2) พบว่าเชื้อแอสกีโนมัยซีทมีการเจริญและสร้างสปอร์ในระยะเวลา 7-14 วัน นอกจากนี้เชื้อแอสกีโนมัยซีทมีการสร้างสีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ดังนี้ SM0311102, SM0212103, SM1622107, SM1512115, SM1922104, SM1922206, SM1712108, SM1912109, SM1912114, SM141212, SM0711201, SM1412105, SM1422110, SM1322211 และ SM17121135

ทำการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอสกีโนมัยซีท พบว่าความสามารถในการย่อยโปรตีนในอาหาร Skim milk agar ร้อยละ 20 ให้ผล (+) คือ สามารถย่อยสลายโปรตีนเกิดเป็นเคลียโซนในสโรวโคโลนี การทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาติน พบว่าเชื้อแอสกีโนมัยซีทร้อยละ 20 ให้ผล (+) คือสามารถสร้างเอนไซม์ Gelatinase ออกมาย่อยสลายเจลาตินได้ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งของเชื้อแอสกีโนมัยซีท พบว่าร้อยละ 20 ให้ผล (+) คือ สามารถย่อยสลายแป้งได้ จะเกิดเคลียโซนใสเมื่อทดสอบกับไอโอดีน ทดสอบความสามารถการหมักน้ำตาลของเชื้อแอสกีโนมัยซีทในน้ำตาลกลูโคส พบว่าร้อยละ 86.67 ได้ผล A/+ หรือ W/+ แสดงถึงความสามารถในการหมักน้ำตาลได้และเกิดแก๊สจากการหมัก ในน้ำตาลซูโครสปร้อยละ 53.33 ในน้ำตาลแลคโตสปร้อยละ 26.67 ในน้ำตาลไซโลสปร้อยละ 80 และในน้ำตาลแมนนิทอลสปร้อยละ 13.33

ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่เกิดการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า มีเชื้อแอสกีโนมัยซีท 4 ไอโซเลท จากการคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทบริเวณดินป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี และเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจากดินบริเวณธารน้ำร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทราภรณ์ และคณะ, 2559) 2 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็น 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังนี้

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ SM0711201 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้เฉลี่ย 12.37 มิลลิเมตร , *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้เฉลี่ย 9.46 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้เฉลี่ย 23.09 มิลลิเมตร และเชื้อ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ได้เฉลี่ย 21.38 มิลลิเมตร

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ SM1622107 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้เฉลี่ย 10.83 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้เฉลี่ย 16.85 มิลลิเมตร และเชื้อ *Kocuria rhizophila* 9341 ได้เฉลี่ย 26.86 มิลลิเมตร

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ SM1912109 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้เฉลี่ย 12.16 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้เฉลี่ย 29.21 มิลลิเมตร และเชื้อ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ได้เฉลี่ย 11.06 มิลลิเมตร

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ SM1712113 สามารถยับยั้งเชื้อ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้เฉลี่ย 10.53 มิลลิเมตร และเชื้อ *Kocuria rhizophila* 9341 ได้เฉลี่ย 21.68 มิลลิเมตร

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ BK121 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้เฉลี่ย 5.64 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้เฉลี่ย 8.61 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ได้เฉลี่ย 26.15 มิลลิเมตร และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้เฉลี่ย 18.87 มิลลิเมตร

เชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลทที่ BK1232 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 663 ได้เฉลี่ย 7.44 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้เฉลี่ย 8.93 มิลลิเมตร ,เชื้อ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 ได้เฉลี่ย 25.25 มิลลิเมตร และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้เฉลี่ย 30.49 มิลลิเมตร

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 6 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 6 ไอโซเลทที่ทำให้ผลมีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์จากการทดสอบด้วยวิธี Preliminary test เชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 6 ไอโซเลทถูกนำมาเลี้ยงต่อเพื่อสกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตทและสารสกัดที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของเมทานอลความเข้มข้น 50 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาผลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทเพื่อทำการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทโดยใช้ 16s rRNA gene และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ โดยใช้เชื้อแอกติโนมัยสีทที่สนใจจากดินป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ SM1322211, SM1422110, SM1712113 และ SM0212103 และใช้เชื้อแอกติโนมัยสีทจากบริเวณธารน้ำร้อน ตำบลสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี (ภัทรภรณ์ และคณะ, 2559) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BK830, BK1030 และ BK530 ทั้งหมดจำนวน 7 ไอโซเลทพบว่า ไอโซเลท BK530 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sundarbansensis* 99.79% ไอโซเลท BK830 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseorubens* 99.72% ไอโซเลท SM1322211 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseoincarnatus* 98.64% ไอโซเลท SM0212103 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces coeruleus* 97.38% ไอโซเลท SM1712113 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces rochei* 100% ไอโซเลท SM1422110 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces hyderabadensis* 99.38% และไอโซเลท BK1030 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseoruber* 96.68% ซึ่งมีแนวโน้มว่า ไอโซเลท SM1322211, SM0212103 และ BK1030 เป็นแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำการแยกเชื้อที่ได้จากดินป่าชายเลนบนอาหาร 2 ชนิด คือ Starch – Casein agar (SCA) และ Zhang’s Starch Soil Extract agar (ZSSE) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากแหล่งธรรมชาติ ส่วนผสมของสารอาหาร สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ รวมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยสีท

5.2.2 สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารว่าสารตัวใดส่งผลให้เกิดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

5.2.3 สำหรับเชื้อที่เป็นสปีชีส์ใหม่ต้องทำการยืนยันกับเชื้อ type strain โดยศึกษาลักษณะเคโมไทป์, ลักษณะทางฟีโนไทป์ และ Whole genome เพื่อแสดงว่าเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญญศิริ มณีสุวรรณ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทจากดินที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กัลป์ยานี จิรศรีพงศ์พันธ์ (2550). เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์. นครปฐม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

กรมทรัพยากร. 2560. น้ำพุร้อนในประเทศไทย. [Online]. Available : <http://www.dmr.go.th> ค้นเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2562

กฤติมา แหวสมจิตต์. 2548. “การคัดเลือกแบคทีเรียที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช.” วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2555). “ความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทในดิน”. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

กฤษมา บ่วงราบ, เกศแก้ว พูลรักษา, วงศกร พงศ์โสภิตานันท์, อีรภัทร เหลืองศุภบุลย์, มนตรี แสงลากเจริญกิจ, ภัครพล พูลสุขโข และเอก แสงวิเชียร. 2557. “การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนมัยซีทที่เรียกหาความร้อนจากไลเคน”. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

คะนิงกานต์ กลั่นบุศย์. 2560. “การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินนาเกลือเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ”. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

งามนิจ นนทโส. (2537). การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากดิน. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.

ชนินทร์ สุริยกุล ณ ออยุธยา. 2545. แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/Biological_Science/2550/Bs/KittitouchPa/chapter2.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2562.

ชนินทร์ สุริยกุล ณ ออยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จริญญา เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนัน และ วิเชียร กิจปรีชา นิช. (2546). เชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่า เขานางรา เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม) หน้า 363-370. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น มิใช่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัยฎกกาญจน์ สิงโตทอง. 2557. “การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีตจากพืชบางชนิดในมหาวิทยาลัยศิลปากรและคุณสมบัติทางชีวภาพ”. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. “การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปัส”. สำนักพิมพ์โตเดียนส์โตร์, กรุงเทพฯ. ตรุณี เทพปาน. (2541). การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีตจากดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์ และคณะ. 2557. “ความหลากหลายทางชีวภาพ คุณสมบัติทางเคมี และการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ก่อโรคและเซลล์มะเร็งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซีตที่เรียในดินป่าไม้ อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว”. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ธีรศักดิ์ สมดี, ชนิษฐาน ตั้งชีวเจริญ และเตือนใจ ทางกลาง. (2545). การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีตจากดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นวลรัตน์ หนูขาว (2554). “การแยกและการคัดเลือกแอกติโนมัยซีตที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.” สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พานทอง กุลสันติวงศ์. (2550). ความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยซีตจากดินบริเวณภูหินลาดช่องฟ้า. คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

ยุทธการ ยะนันโต (2507). การผลิตสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *Actinomycetes* บางชนิดเพื่อยับยั้งเชื้อรา *Colletotricium gloeosporioides*. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. (2546). การแยกแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรัง ปลวกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, มรกต สุโขติรัตน์ และ ชินจิ โตกุยามา. (2548). แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่จากดิน ชายฝั่งที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา. ใน 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 - 20 October 2005.

ลลิตา วังเงิน. 2554. “การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอกติโนมัยซีตหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักขมี ศุภระกาญจนะ. 2556. “การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ”. ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วสุ ปฐมอารีย์. 2557. “แอคติโนมัยซีท์จากตะกอนชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทยและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ”. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วัลญา เลขยันต์. (2541). การศึกษาจำนวน Actinomycetes ในดินใต้ต้นไม้ต่างๆ บริเวณภูตาคาในเดือนเมษายน, มิถุนายน และพฤศจิกายน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิชัย ศุภลักษณ์, เศรษฐสิทธิ์ แสงโสภณจิตร, กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2552. “การศึกษาความหลากหลายของ แบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุล”. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศรีสกุล ชนะพันธ์ (2553). “การแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้.” สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ศูนย์ศึกษารวมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ. 2555. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://www.saensukcity.com/%E0%B8%9B%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B9%80%E0%B8%A5%E0%B8%99%E0%B8%8A%E0%B8%A5%E0%B8%9A%E0%B8%B8%E0%B8%A3%E0%B8%B5.html>. ค้นเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2562.

สนธิ อักษรแก้ว. 2542. ระบบนิเวศป่าชายเลน (Mangrove ecosystem). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.sci.psu.ac.th/chm/biodiversity/mangrove.html>. ค้นเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2562.

สุภานันท์ ซาลิม (2548). สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยซีท์ในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 350 น.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน, นครปฐม. 382 น.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และคณะ. 2549. อนุกรมวิธานและสารทุติยภูมิของแอคติโนมัยซีท์ที่คัดเลือกได้จากดินเกาะเสม็ด. หน้า 1-68. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ก่อนการให้บริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533. ดีเอ็นเอพาหะ. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร. 253 น.
 อำไพทิพย์ สุขหอม. 2553. “ความหลากหลายของแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีทบริเวณหมู่เกาะตะรุเตา”.
 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abebe B. et al (2013) Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. Asian Pac J Trop Dis 3(5): 375-381.

Alberts, F., S.E. Denman, G. Wright and Z. Yu. 1983. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. J. Anim. Sci. 20(20): 283-294.

Alim Al-Bari, M. Abdul; Sayeed, M. Abu; Khan, Alam; Islam, I. Robiul; Khondokar, Proma; Sazedur Rahman, M. M.; Ul Islam, M. Anwar. (2007). “In vitro Antimicrobial Activities and Cytotoxicity of Ethyl Acetate Extract from *Streptomyces maritimus*.” Biotechnology Vol. 6 1:81.

An, D., B. Chai and Z. Dong. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos aaurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. Poutl. Sci. 4(1): 207-205.

Anibou M et al. (2008) Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. World J Microbiol Biotechnol 24, 2019-2025.

Augustin, G., F. Wright and H.J. Flint. 1994. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen . Int. J. Cysts. Bact. 44(4): 246-255.

Deng, W., D. Xi, H. Mao and M. Wanapat. 2007. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Mol Biol Rep.[Online]Available:<http://www.las.ac/MolBiolRep/jull02005/124.pdf>.15/12/201

Freifelder, J. 1985. Identification of characteristic oligonucleotides in bacterial 16S ribosomal RNA sequence dataset. Bioinformatics. 18(2): 244-250.

Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. European Journal of Soil Biology 38(1): 85-88.

Goodfellow, M. and Haynes, J. A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes, pp. 452-472. Edited by L. OrtizOrtiz, L.F. Bojalil and V. Yakoleff. New York: Academic Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Harry, M., B. Gambier, Y. Bourezgui and E. Garnier-Sillam. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *J. Basic Analysis*. 27(2): 439-442.
- Higgins, D., J. Thompson and T. Gibson. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22(3): 4673-4680.
- Huddleston, A., Cresswell, N., Neves, M.C.P., Beringer, J.E., Baumberg, S., Thomas, D.I., Wellington, E.M.H. (1997): Molecular detection of streptomycin producing *Streptomyces* in Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1288-1297.
- Kamara, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89 (1): 124-135.
- Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwilailaichitr. 2004. Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *J. Basic Microbiol.* 44(3): 430-444.
- Karp, G. 2000. *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*. 2nd ed., Cornell University press, New York, USA. 476 p.
- Keswani J, Whitman WB. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:667-78.
- Kim, S. B., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Han, S. K., Kim, K. O., Rhee, M. S. and Bae, K. S. 2004. *Kocuria marina* sp. Nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1617-1620.
- 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
- Kovacs, G., J. Burghardt, S. Pradella, P. Schumann, E. Stackebrandt, and K. Marialigeti. (1999) *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1:167-73
- Madigan, M.T. and J.W. Martinco. 2006. *Brock Biology of Microorganism*. 11nd ed., Association of Office Analytical Chemist, New Jersey, USA 368 p.

- Mahadevan, B. and Crawford, D.L. (1997). "Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC 108", *Enzyme and Microbial Technology*. 20(5), 489-493.
- Meena, P.D., A.K. Sharma, S.K. Jha and C Chattopadhyay. (2006). Impact of fungal diseases on yield of Indian mustard – farmers' perception and on-farm success of garlic clove extract in management of *Sclerotinia* rot. *Ind. J. Pl. Prot.* 34: 229-232
- Minas, W., Bailey, J. E. and Duetz, W. 2000. *Streptomyces* in micro-culture: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 297-305.
- Miyadoh. (1997). โคลีนีของแอคตินอมัยซีที่แยกได้จากดิน. Mahidol and Osaka University Collaborative Research Center for Biosciences and Biotechnology.
- Mohammadipanah, F. and Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity And Biological Activity. *Frontiers in Microbiology* 6. Article1541
- Mulhardt, C. 2007. *Molecular Biology and Genomics*. 4th ed., Oxford Elsevier Inc, London, England. 476 p.
- Phongsopitanun, W., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., Ohkuma, M. & Tanasupawat, S. (2014). *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2605–2610.
- Robert Schlager,1 Keith E. Simmon,1 and Mark A. Fisher. 2012. A Systematic Approach for Discovering Novel, Clinically Relevant Bacteria. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 18, No. 3, March 2012.
- Shinji, M. (1997). Phylogenetic relationship of actinomycetes. In M. Shinji. *Atlas of actinomycetes*. Japan: Asakura publishing.
- Singtotong, C. and Taechowisan, T. (2014) Endophytic Actinomycetes from *Vernonia cinerea* (L.) Less. And Their Bioactivities. Proceeding in 11th international KU-KPS conference, 8-9 December 2014, Kasetsart University Kamphaeng San Campus, Thailand. (Poster presentation)
- Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Coelho, L.C.B.B. and Araújo J.M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. Endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology* 83: 105-109.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Takizawa M, Colwell RR, Hill RT (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 59:997–1002.
- Tamura, T., Suzuki, S., and Hatano, K.: *Acrocarpospora* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *Int. J. Evol. Microbiol.*, 50, 1163–1171 (2000).
- Thawai, C. 2012. "Isolation and Characterization of Antibiotic-producing Actinomycetes from hot spring sediment of Thailand." : 215-219.
- Vobis, G. 1997. Morphology of Actinomycetes. In *Atlas of Actinomycetes* (Miyodo, S., ed.). The Society for Actinomycetes Japan. P. 181-190. Japan.
- Waksman, S. A.: Classification, identification and description of genera and species. *The Actinomycetes*, vol. 2, p. 328–334. Williams & Wilkins, Baltimore (1961).
- Wellington, E. M. H. and Cross, T. (1983). Taxonomy of antibiotic producing Actinomycetes and new approaches to their selective isolation. In: "Progress in industrial microbiology?" Bushell, M. E. (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 36.
- Williams ST, Cross T (1971) *Actinomycetes, methods in microbiology*, vol 4. Academic Press, New York.
- Yang, Q., Lei, A.P., Li, F.L., Liu, L.N., Q.J. Zan, P.K.S. Shin, S.G. Cheung, N.F.Y. Tam. 2014. "Structure and function of soil microbial community in artificially planted *Sonneratia apetala* and *S. caseolaris* forests at different stand ages in Shenzhen Bay, China". *Marine Pollution Bulletin*. 85 : 754-763.
- Xu,J., 2015. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. *RSC Adv*. 5, 841–892. <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA11756E>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร อาหารจะถูกนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Starch – Casein agar (SCA)

Soluble starch	10.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
KNO ₃	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.0	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Artificial seawater	37.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.2		

2. Zhang's Starch Soil Extract agar (ZSSE)

Soluble starch	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม
Soli extract solution	1,000	มิลลิลิตร
Agar	10.0	กรัม
Artificial seawater	37.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2		

Soil extract

Humic soil (ดินจังหวัดนครสวรรค์)	1.0	กิโลกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรองด้วยสำลี และทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (นำส่วนใสไปใช้)

นึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Yeast extract – Malt extract agar (YEME agar)

Malt extract	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.3		

4. International *Streptomyces* Project medium no.2 (ISP2)

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.0 – 7.3		

5. Inorganic salts starch agar no.4 (ISP4)

Soluble starch	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

6. Bouillon gelatin broth

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.0 – 7.2

7. Nutrient agar

Peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

8. Skim milk agar

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.0 – 7.2

9. Muller Hinton agar (MHA)

Beef extract	2.0	กรัม
Casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

10. Glucose Yeast Extract agar (GYE)

Yeast extract	10.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

11. Sabourand Dextrose agar (SDA)

Dextrose	40.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 5.4 – 5.8

12. Phenol Red glucose (or other sugar) broth

Peptone	10.0	กรัม
---------	------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beef extract	1.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.4		

**หมายเหตุ Sugar แต่ละชนิดเตรียมแยกหลอดกัน ได้แก่ Dextrose, Sucrose, Xylose, Lactose, Mannitol



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดินทั้ง 2 ครั้ง ตำแหน่งจากบริเวณศูนย์การเรียนรู้ศึกษาระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

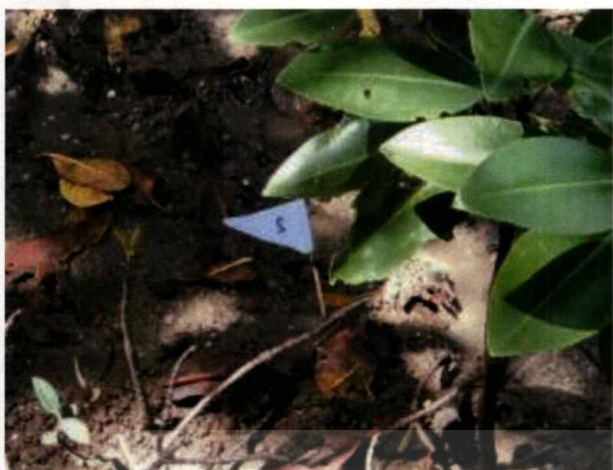


รูปที่ 1 (ข) แสดงถึงสภาพแวดล้อมของจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน

(1) สภาพแวดล้อมของจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนครั้งที่ 1 วันที่ 15 ตุลาคม 2561

(2) สภาพแวดล้อมของจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนครั้งที่ 2 วันที่ 3 มีนาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2

3



7

รูปที่ 2 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน จุดที่ 2,3 และ7 ในการเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 1 วันที่ 15 ตุลาคม 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



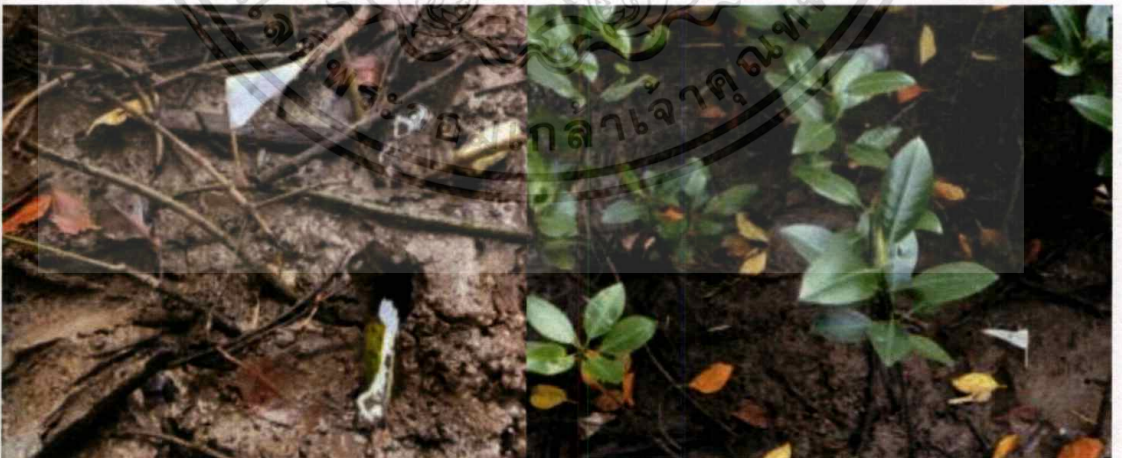
3

4



5

6



7

9

รูปที่ 3 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน จุดที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 9 ในการเก็บตัวอย่างดิน
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ครั้งที่ 2 วันที่ 3 มีนาคม 2562
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุที่ต้องแจ้งถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจาก (Das, 2013)

วิธีการคำนวณน้ำหนักดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักบีกเกอร์ และสารแขวนลอยของดิน ก่อนอบ (กรัม)

$$\text{น้ำหนักบีกเกอร์และดินก่อนอบ} = \text{น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม)} + \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินก่อนอบ(กรัม)}$$

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม)

$$\text{ปริมาณน้ำหนักดิน (กรัม)} = \begin{aligned} & \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์ก่อนอบ (กรัม)} \\ & - \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์หลังอบ (กรัม)} \end{aligned}$$

วิธีการหาปริมาณความชื้นในดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)

$$\text{น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)} = \text{น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม)}$$

คำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน (%)

$$\text{ปริมาณความชื้นในดิน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำหนักดิน}}{\text{น้ำหนักดินหลังอบ}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (Slide culture) และการย้อมสีด้วย Methylene blue (บงกชวรรณ, 2550)

การศึกษาลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีต นิยมใช้เทคนิค Slide culture เนื่องจากเส้นใยจะไม่แตกหักทำให้สปอร์ไม่หลุดออกจากเส้นใยซึ่งจะทำให้เราเห็นเส้นใยที่สมบูรณ์ได้ จากนั้นทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค wet mount และย้อมสีด้วย Methylene blue เพื่อให้เห็นโครงสร้างของเส้นใยได้มากขึ้น มีวิธีการทำดังนี้

1. นำสำลี คอตตอนบัด 2 อัน สไลด์และแผ่นปิดสไลด์ ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
2. เทอาหาร YEME ให้มีความสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งให้แข็ง
3. ใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ กรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1x1 มิลลิเมตร
4. วางอาหารที่ตัดแล้วลงบนสไลด์ที่วางอยู่ในจานเพาะเลี้ยงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
5. เชียเชื้อแอสโคไมซีตทั้ง 4 มุมของวุ้นอาหารและนำกระจกปิดสไลด์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางทับลงไป
6. เทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในสำลี จากนั้นทำการปิดฝาจานเพาะเลี้ยงและพันด้วยพาราฟิล์ม
7. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาย้อมด้วยสี Methylene blue และส่องดูลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

(โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2555)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับกิจกรรมด้านการเจริญของเชื้อ ซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่าได้กับจำนวนเซลล์โดยประมาณมีค่าเท่ากับ 1.0×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบกับการปรับระดับความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 – 0.1 โดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร

ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1% v/v Conc. H_2SO_4 99.50 มิลลิลิตร

1.175% w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.50 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่มีน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรและทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร และสารละลายจากข้อ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 มาบรรจุใส่ในหลอดฝาเกลียวปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหยและนำไปเก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 2 – 30 องศาเซลเซียส
4. ก่อนใช้งานต้องเขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน ซึ่งสารดังกล่าวมีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 1 ปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินและปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่ หายไป เมื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักพอยล์ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและพอยล์หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินหลังอบ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (%)
จุดที่ 1	0.509	2.731	1.318	1.922	51.74
จุดที่ 2	0.338	2.570	1.567	1.341	39.03
จุดที่ 3	0.299	2.403	1.286	1.416	46.48
จุดที่ 4	0.341	2.060	1.170	1.231	43.20
จุดที่ 5	0.312	2.761	1.606	1.467	41.83
จุดที่ 6	0.333	2.301	1.222	1.412	48.24
จุดที่ 7	0.420	2.581	1.323	1.678	48.74
จุดที่ 8	0.414	2.527	1.573	1.368	37.75
จุดที่ 9	0.418	2.164	0.984	1.598	54.53
จุดที่ 10	0.421	2.362	1.402	1.381	40.64

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด - ด่างของตัวอย่างดิน

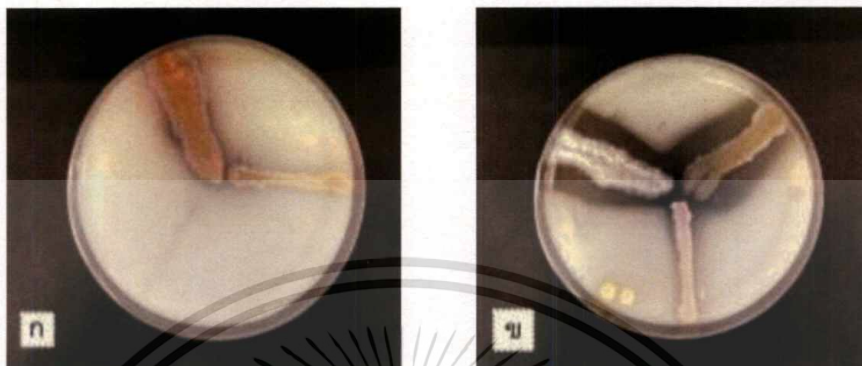
จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ค่าความเป็นกรด - ด่าง			ค่าเฉลี่ย
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
จุดที่ 1	2.731	7.2	7.1	7.1	7.1
จุดที่ 2	2.570	7.2	7.0	6.9	7.0
จุดที่ 3	2.403	7.1	7.4	7.0	7.2
จุดที่ 4	2.060	7.0	7.3	6.9	7.1
จุดที่ 5	2.761	7.2	7.0	6.8	7.0
จุดที่ 6	2.301	7.1	7.1	6.8	7.0
จุดที่ 7	2.581	7.3	7.2	6.8	7.1
จุดที่ 8	2.527	7.3	7.3	6.9	7.2
จุดที่ 9	2.164	7.2	7.1	6.9	7.1
จุดที่ 10	2.362	7.1	6.8	6.9	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

1. การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptpnization)



(ก) ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนในนมแสดงผลเป็น -

(ข) เกิดการย่อยสลายโปรตีนในนม แสดงผลเป็น +

2. การย่อยสลายเจลาติน (Gelatinization)

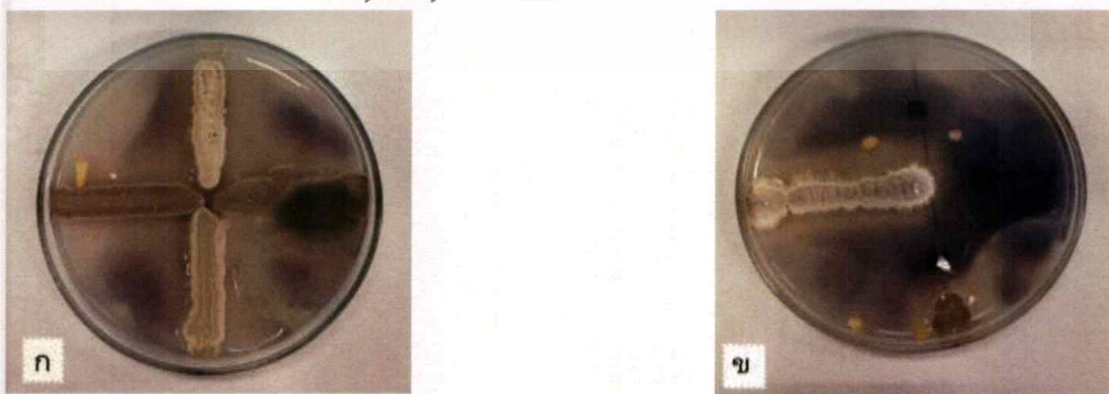


(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ

(ข) เกิดการย่อยสลายเจลาติน แสดงผลเป็น +

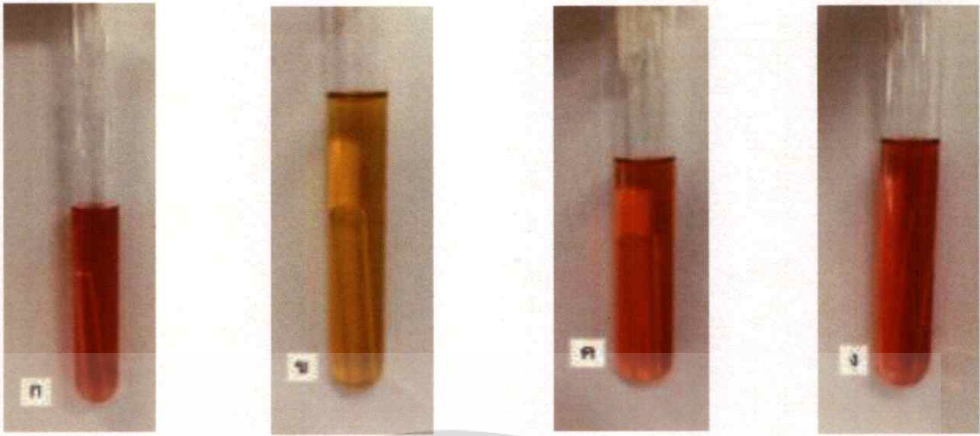
(ค) ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาตินแสดงผลเป็น -

3. การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้เองเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำในประโยชน์ทางการค้า
 (ก) เกิดการย่อยสลายแป้ง แสดงผลเป็น + (ข) ไม่เกิดการย่อยสลายแป้ง แสดงผลเป็น -
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การย่อยสลายน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ไซโลส, แลคโตส และ แมนนิทอล



(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ

(ข) เกิดการย่อยสลายน้ำตาล แสดงผลเป็น A/+

(ค) เกิดการย่อยสลายน้ำตาลเล็กน้อย แสดงผลเป็น W/+

(ง) ไม่เกิดการย่อยสลายน้ำตาล แสดงผลเป็น K/-

***หมายเหตุ

A คือ Acid	= เกิดการหมักน้ำตาลมีการเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง
K คือ Alkaline	= ไม่เกิดการหมักน้ำตาล
W คือ Weakly	= เกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อยมีการเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีส้ม
+	= เกิดการสร้างแก๊ส
-	= ไม่เกิดการสร้างแก๊ส

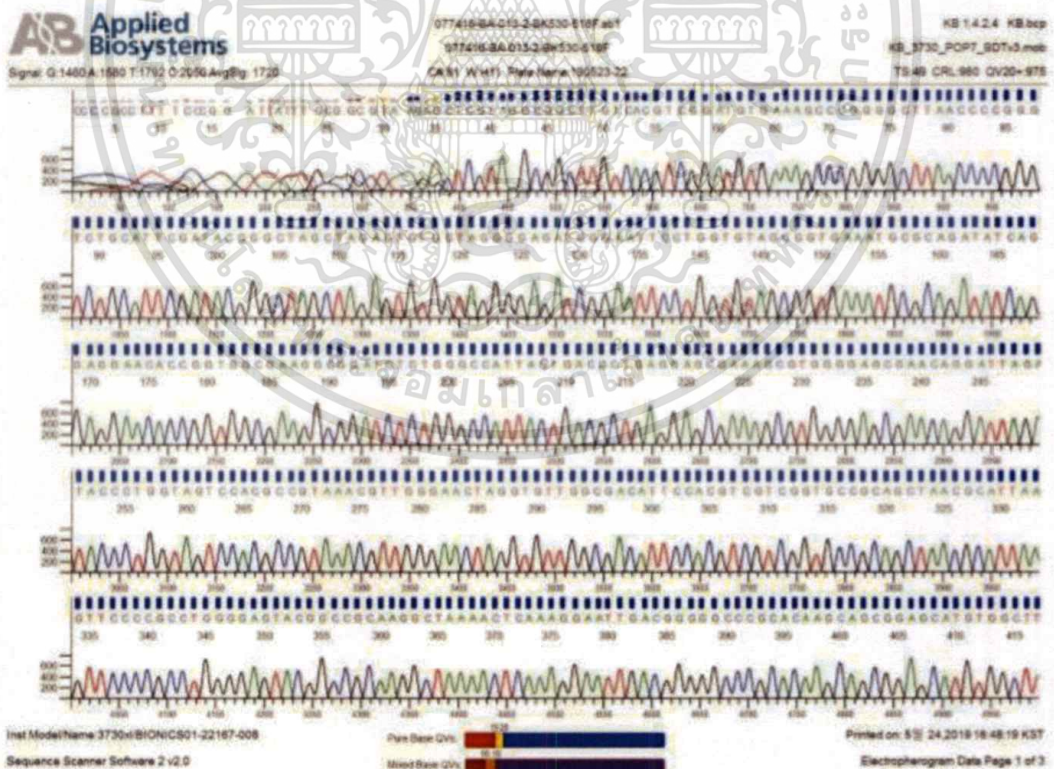
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การจัดจำแนก 16s rRNA และการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ DNA หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วที่ A260/A280

ไอซ์เลท	ความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA ng/ul
BK530	135.9
BK830	113.8
SM1322211	177.9
SM0212103	205.0
SM1712113	150.5
SM1422110	124.7
BK1030	122.2



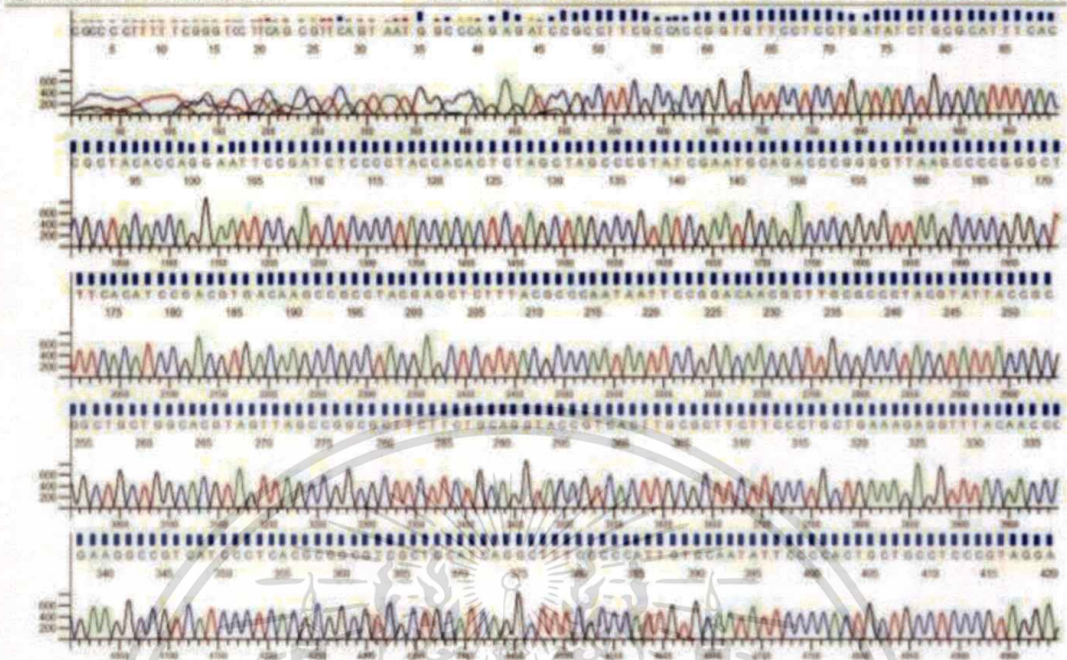
รูปที่ 1 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในการวิเคราะห์
เอกสารเป็นเอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่พบในดินที่ปลูกข้าวโพดหวาน ไม่อยู่ในชุดที่เก็บใบไม้บริเวณที่ทำการค้า
ไม่ว่าการณีใดๆ ที่ดิน อีพีทั้งหมดที่เก็บได้และได้ของดินที่ปลูกข้าวโพดหวานของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



077416-BA-014-2-BK530-800R.ab1
077416-BA-014-2-BK530-800R
CR-96 WA12 Plate Name:190523-22

KB_1424_KB.bcp
KB_3730_POP7_BOTv3.mob
TS-49_CRL753_QV20+751

Signal: G:1221 A:1177 T:1706 C:2354 AvgSig: 1614



Inst Model Name: 3730xl/BI0NC501-22167-008

Pure Base QV%

Printed on: 5/3/24/2019 16:48:21 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Mixed Base QV%

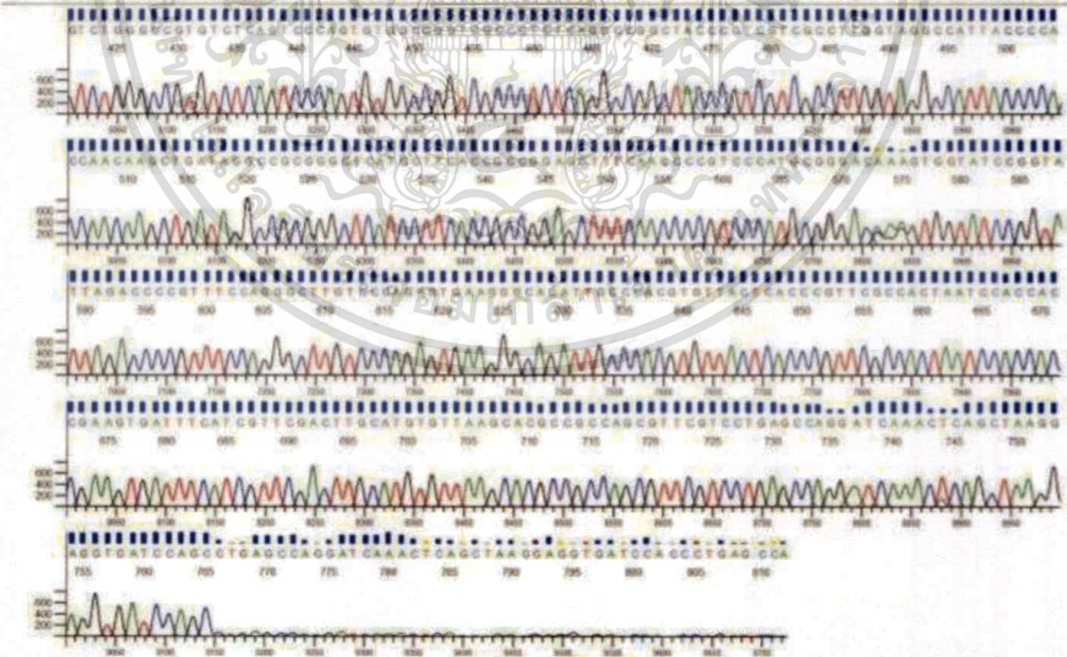
Electropherogram Data Page 1 of 2



077416-BA-014-2-BK530-800R.ab1
077416-BA-014-2-BK530-800R
CR-96 WA12 Plate Name:190523-22

KB_1424_KB.bcp
KB_3730_POP7_BOTv3.mob
TS-49_CRL753_QV20+751

Signal: G:1221 A:1177 T:1706 C:2354 AvgSig: 1614



Inst Model Name: 3730xl/BI0NC501-22167-008

Pure Base QV%

Printed on: 5/3/24/2019 16:48:21 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Mixed Base QV%

Electropherogram Data Page 2 of 2

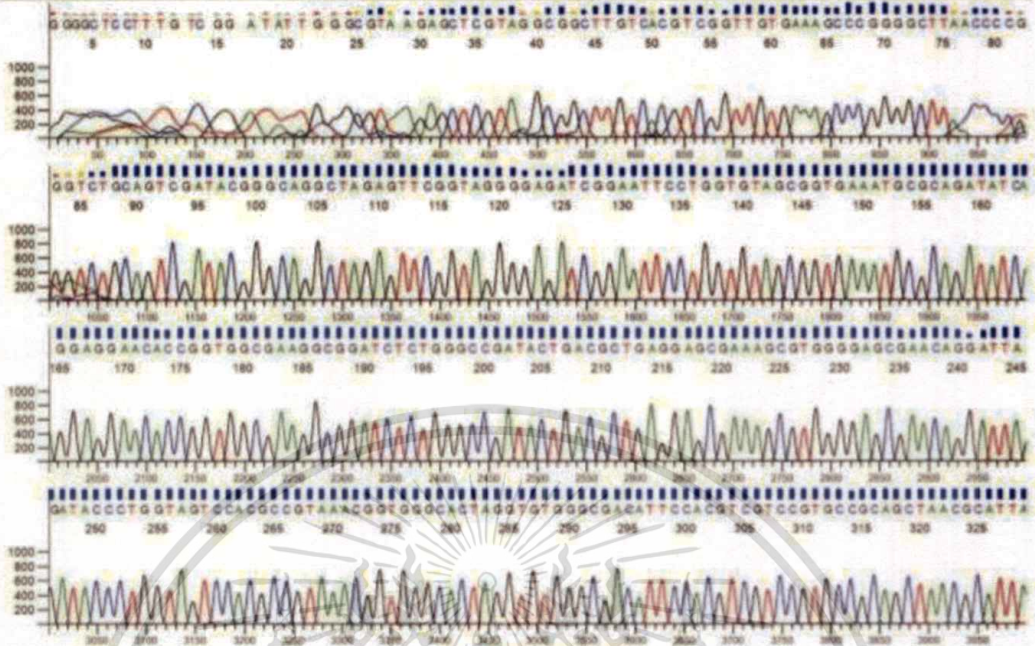
เอกสารนี้เป็นรูปที่ 2 กรัฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverse โดย ใช้ primer 800R ในการการค้น
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งนี้วิเคราะห์ลำดับเบสของ BK530 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 30 และ 766 ที่มีการนำไปใช้



077416-BA-001-1-BK830-518F.ab1
077416-BA-001-1-BK830-518F
CR:12 W:02 Plate Name:190523-6

KB.1.2 KB.bcp
KB_3730_POP7_BOTv3.mob
TS:47 CRL:906 QV20+891

Signal: G:623 A:574 T:602 C:781 AvgSig: 645



Inet ModelName:3730v1ABI3730-25197-003
Sequence Scanner Software 2 v2.0



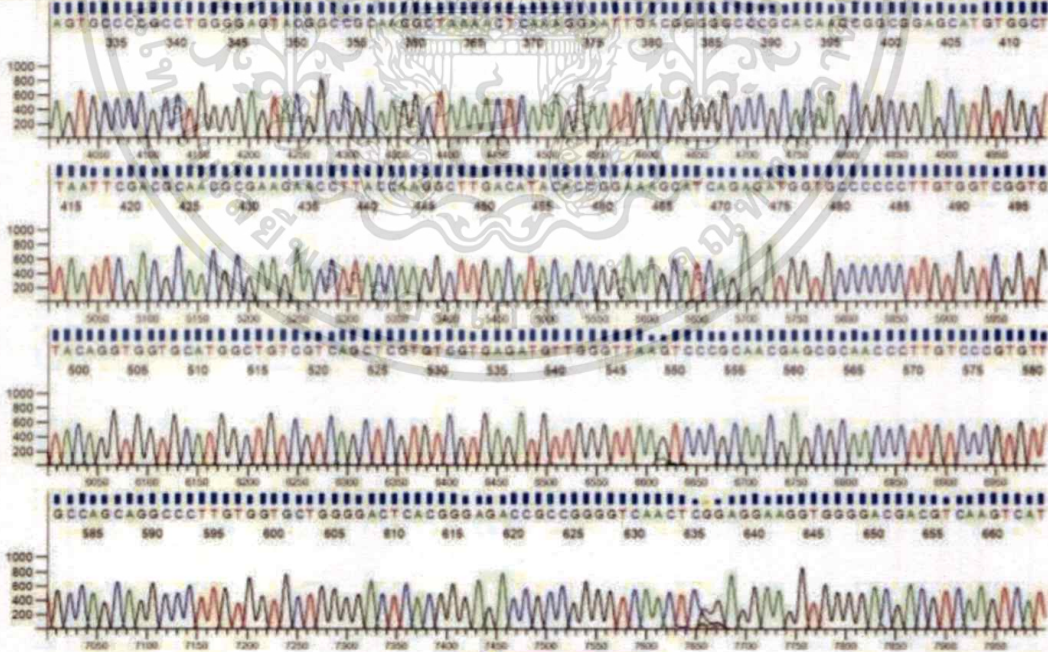
Printed on: 5/24/2019 09:19:25 KST
Electropherogram Data Page 1 of 3



077416-BA-001-1-BK830-518F.ab1
077416-BA-001-1-BK830-518F
CR:12 W:02 Plate Name:190523-6

KB.1.2 KB.bcp
KB_3730_POP7_BOTv3.mob
TS:47 CRL:906 QV20+891

Signal: G:623 A:574 T:602 C:781 AvgSig: 645

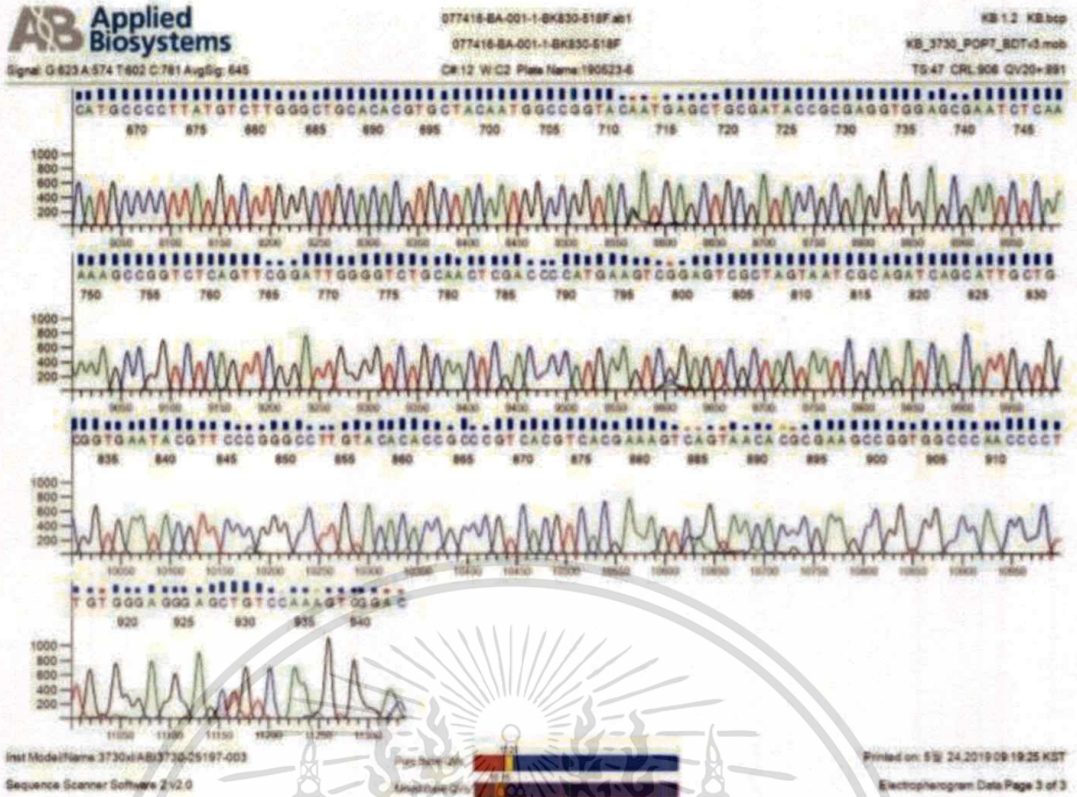


Inet ModelName:3730v1ABI3730-25197-003
Sequence Scanner Software 2 v2.0

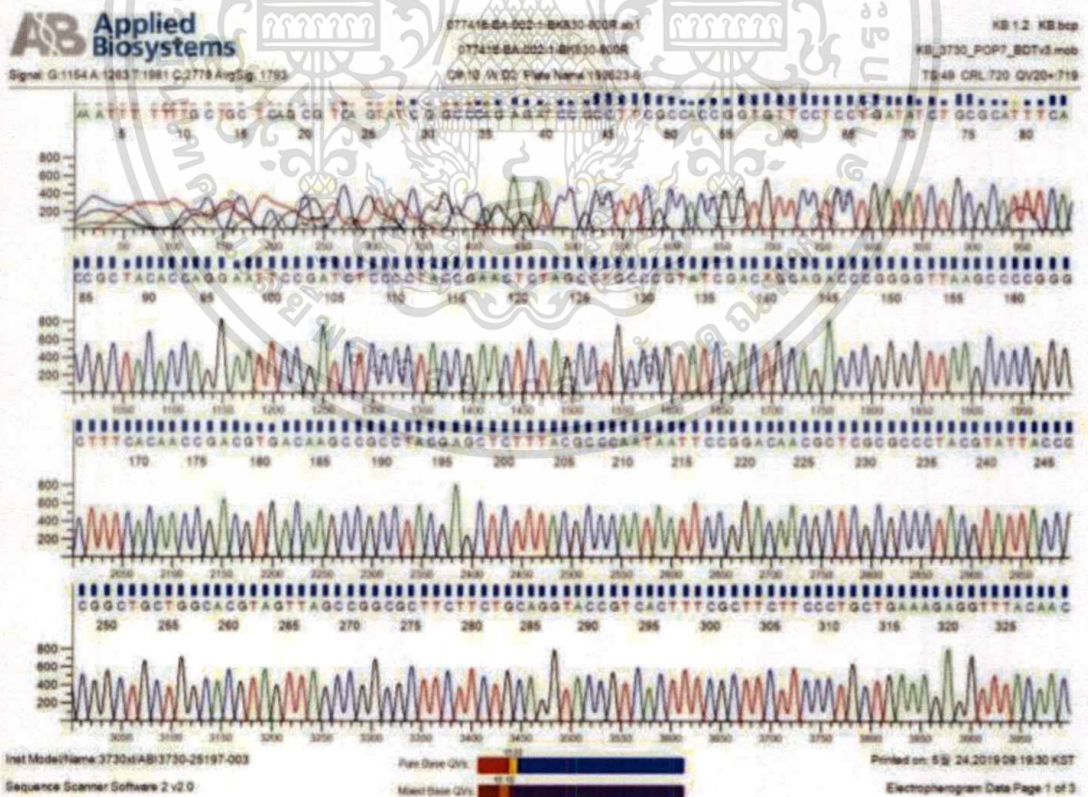


Printed on: 5/24/2019 09:19:25 KST
Electropherogram Data Page 2 of 3

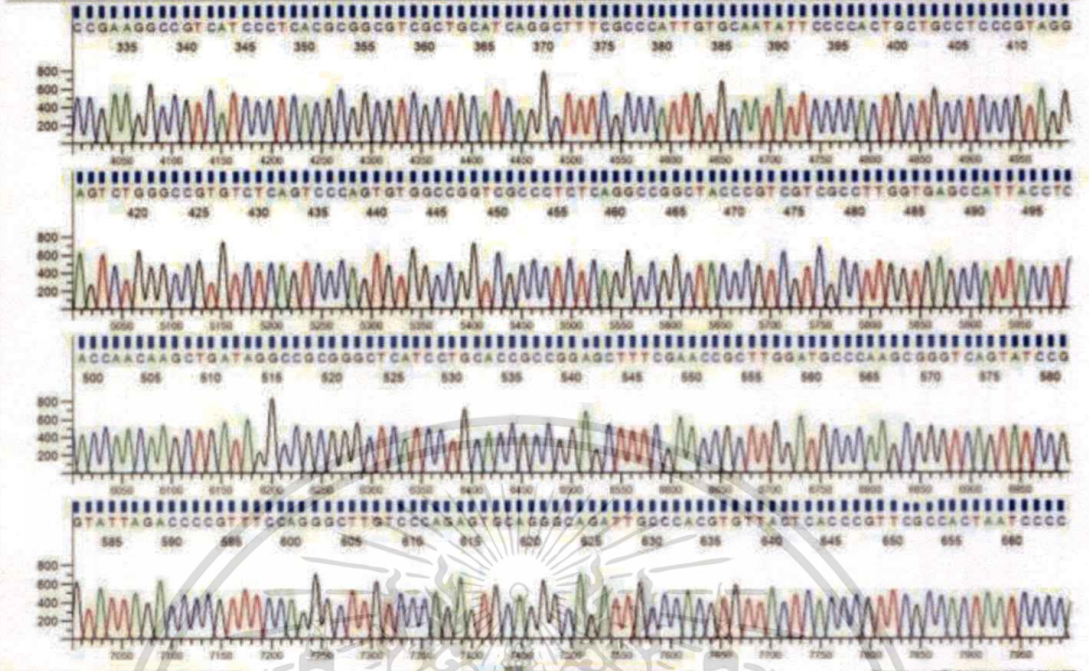
เอกสารรูปที่ 3 กราฟลำดับเบสในกรณี sequence ด้วยสปีด Forward โดยใช้ primer 518F ในกรณีวิเคราะห์ค่า
ไม่ว่าการณีใด ๆ ลำดับเบสของ BK830 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 30 และ 939 อสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



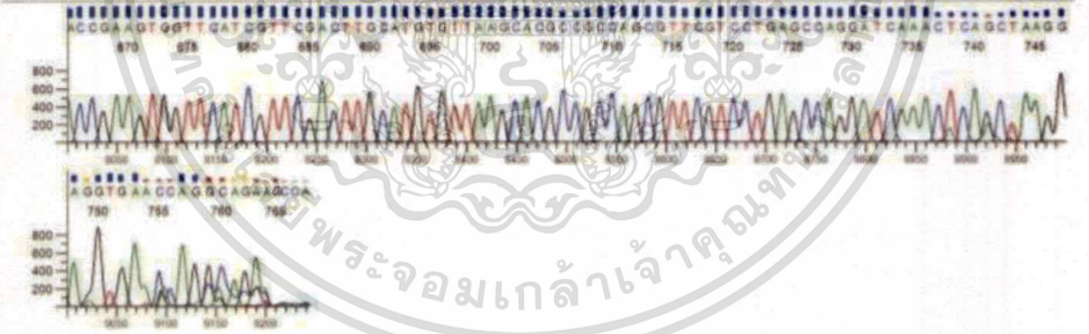
รูปที่ 3 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในการวิเคราะห์ ลำดับเบสของ BK330 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 30 และ 939 (ต่อ)



รูปที่ 4 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้拿去เผยแพร่ขึ้นนิตานการค้า วิเคราะห์ลำดับเบสของ BK830 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 39 และ 760 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



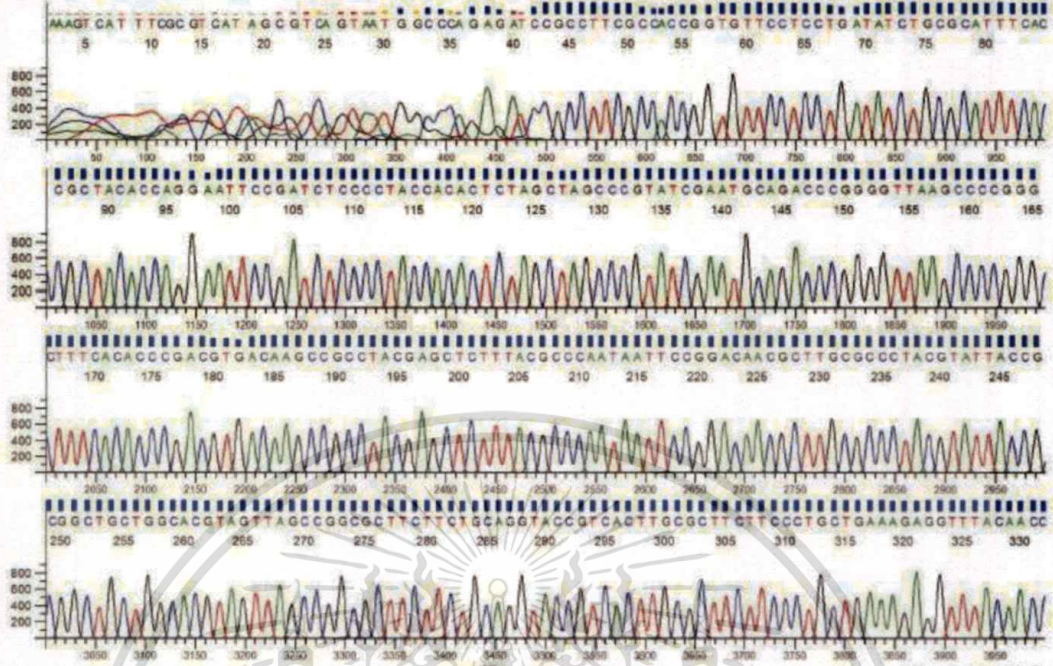
Instr Model Name: 3730x1 AB13730-25197-003
 Sequence Scanner Software 2 v2.0
 Printed on: 5/24/2019 09:19:30 KST
 Electropherogram Data Page 2 of 3



Instr Model Name: 3730x1 AB13730-25197-003
 Sequence Scanner Software 2 v2.0
 Printed on: 5/24/2019 09:19:30 KST
 Electropherogram Data Page 3 of 3

เอกสารนี้เป็นรูปที่ 4 กรัฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverse โดยใช้ primer 800R ในการการค้น
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งลิเคราะห์ลำดับเบสของ BK830 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 39 และ 760 (ต่อ) การนำไปใช้

Signal: G 996 A:1208 T:1893 C:2829 AvgSig: 1729



Inst Model Name: 3730x(ABI)3730-25197-003

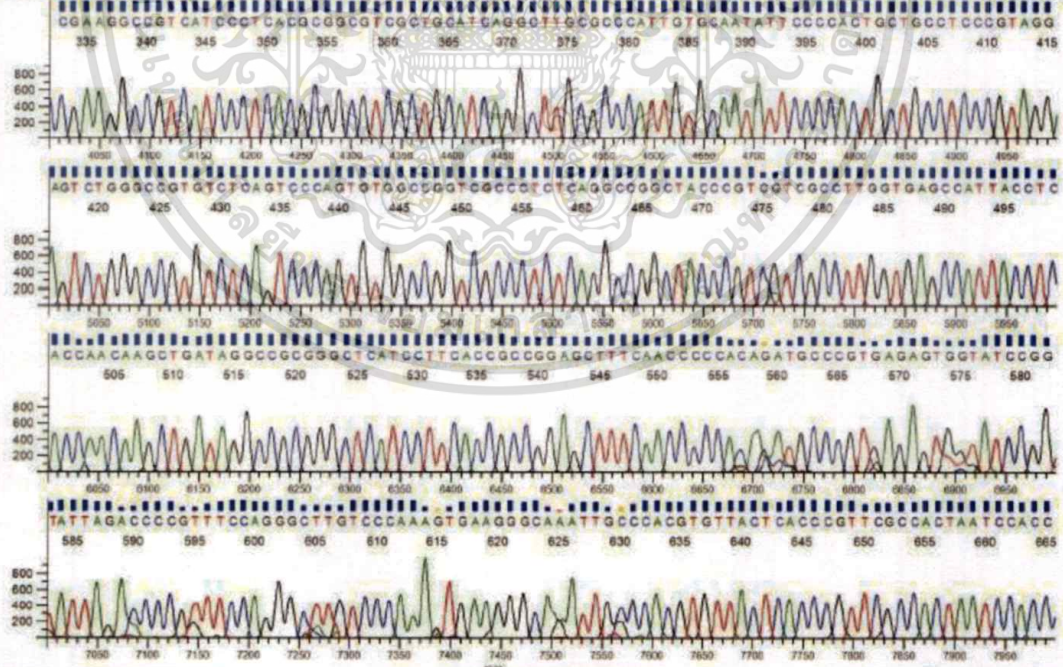


Printed on: 5 มิ 24, 2019 09:19:52 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Electropherogram Data Page 1 of 5

Signal: G 996 A:1208 T:1893 C:2829 AvgSig: 1729



Inst Model Name: 3730x(ABI)3730-25197-003

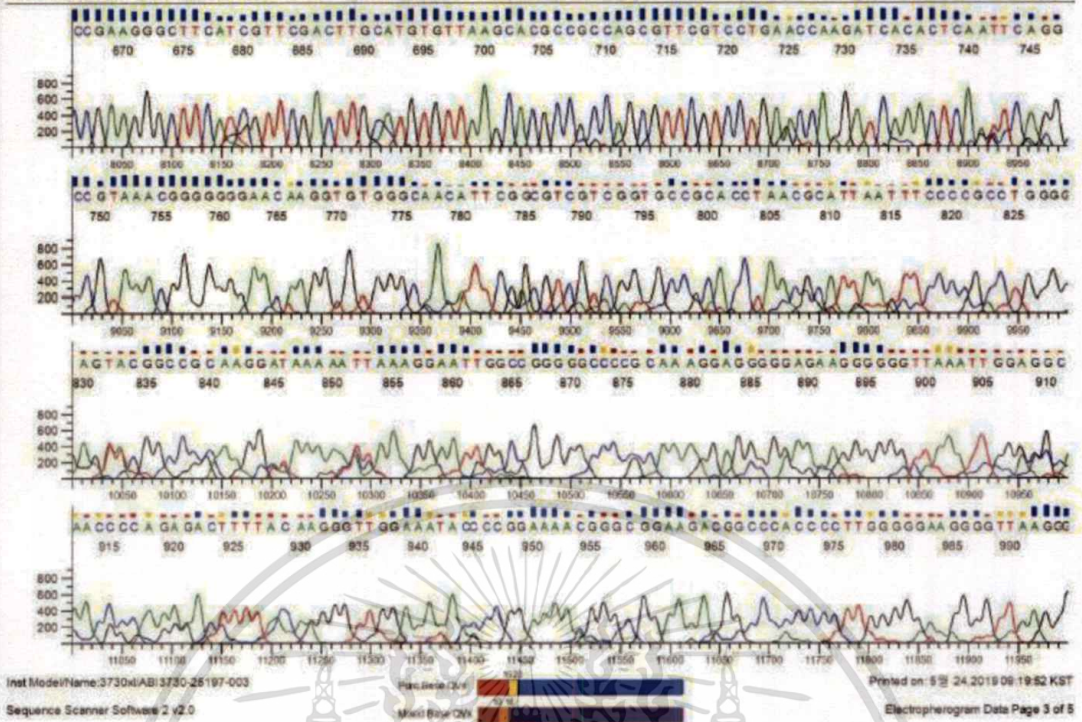


Printed on: 5 มิ 24, 2019 09:19:52 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Electropherogram Data Page 2 of 5

เอกสารนี้เป็นรูปที่ 5 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverse โดย ใช้ primer 800R ในการการค้น
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งนี้วิเคราะห์ลำดับเบสของ BK1030 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 40 และ 778 ที่มีการนำไปใช้



Inst Model Name: 3730x(ABI)3730-25197-003

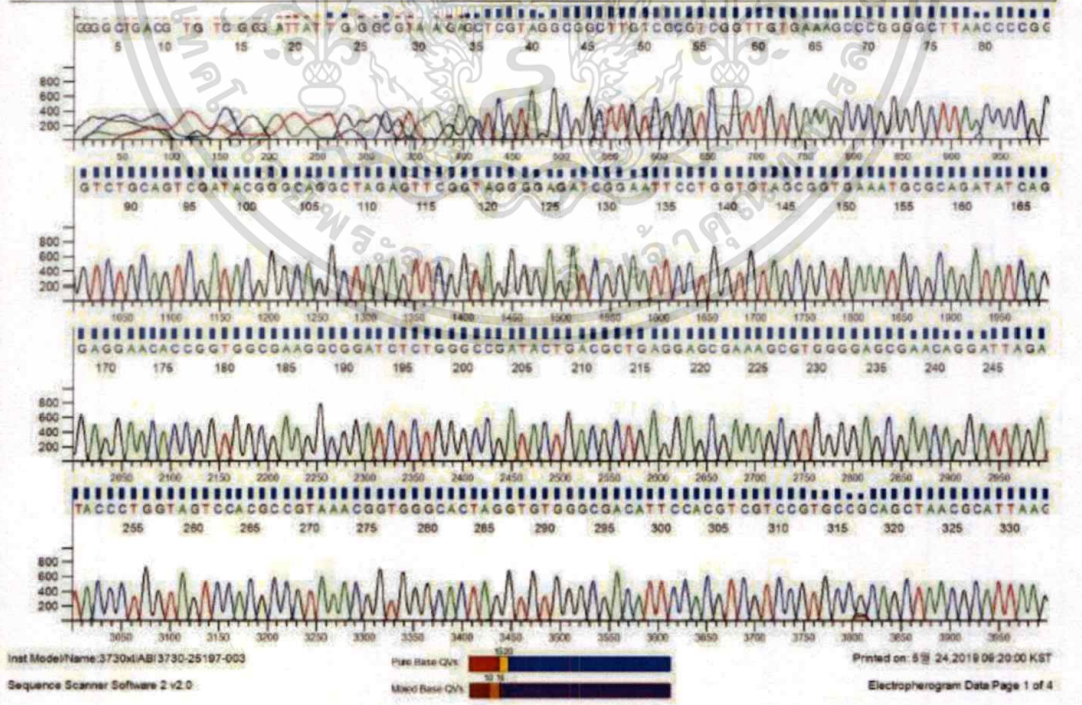


Printed on: 5/24/2019 09:19:82 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Electropherogram Data Page 3 of 5

รูปที่ 5 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของ BK1030 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 40 และ 778 (ต่อ)



Inst Model Name: 3730x(ABI)3730-25197-003



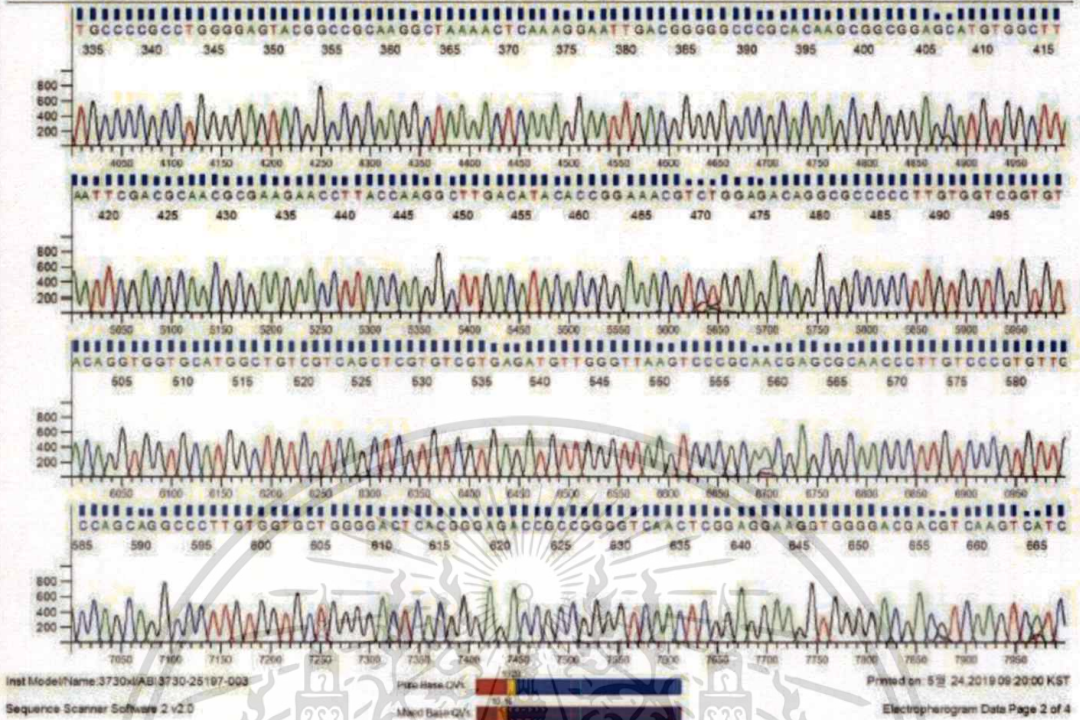
Printed on: 5/24/2019 09:20:00 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

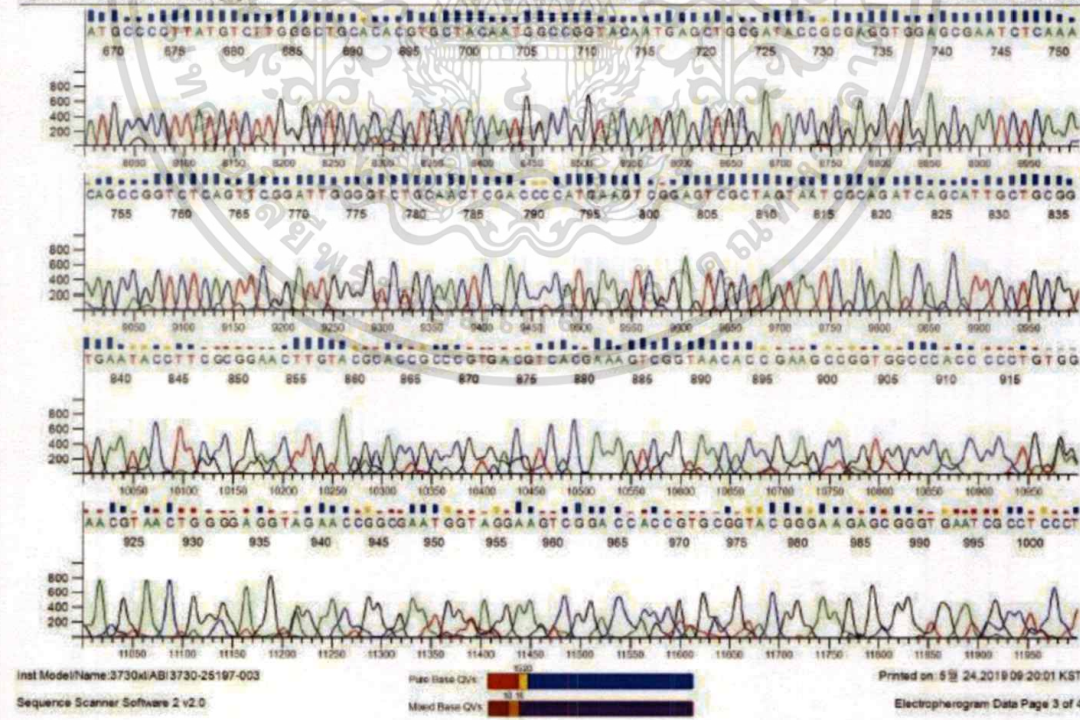
Electropherogram Data Page 1 of 4

เอกสารรูปที่ 6 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในการวิเคราะห์ค่าไม่ว่าการณีใดๆ ลำดับเบสของ SM132221 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 38 และ 910 ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Signal: G:813 A:850 T:952 C:1161 AvgSig: 944



Signal: G:813 A:850 T:952 C:1161 AvgSig: 944



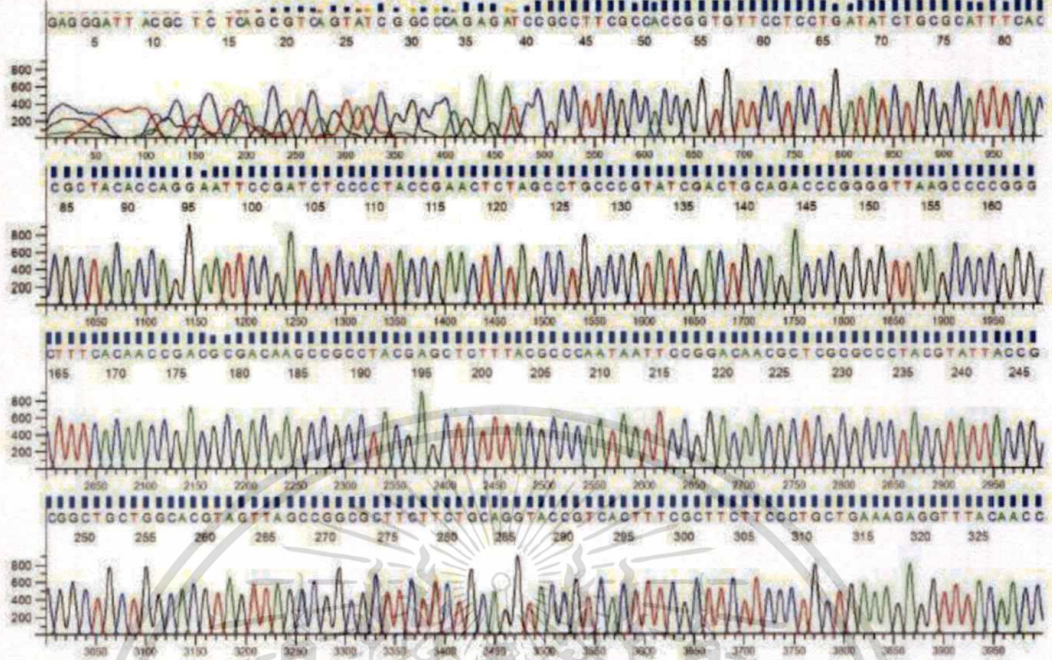
เอกสารรูปที่ 6 กราฟลำดับเบสในกรณี sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในกรณีวิเคราะห์ค่า
ไม่ว่ากรณีใดลำดับเบสของ SM1322211 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 38 และ 910 (ต่อ) จึงที่มีการนำไปใช้



077416-BA-008-1-SM1322211-800R.ab1
077416-BA-008-1-SM1322211-800R
CF 29 W.B3 Plate Name: 190523-6

KB 1.2 KB.bcp
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
TS:46 CRL:737 QV20+757

Signal: G 2173 A 2810 T 4320 C 5989 AvgSig: 3823



Inst Model/Name: 3730M/ABI 3730-25197-003

Pure Base QV: 93.4

Printed on: 5/24/2019 09:20:06 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Mixed Base QV: 93.1

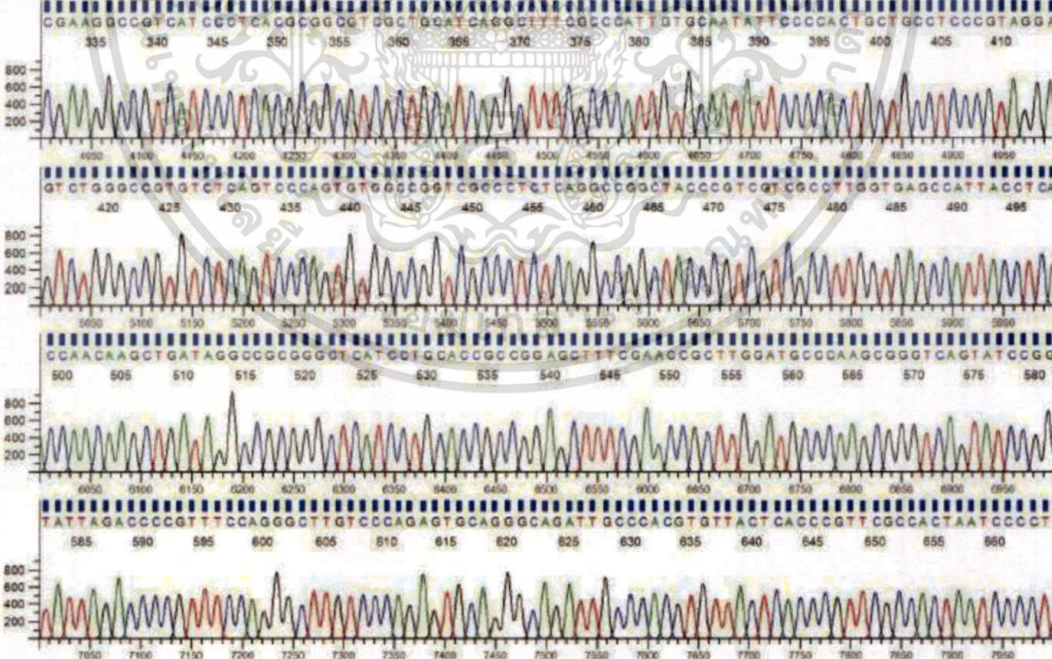
Electropherogram Data Page 1 of 3



077416-BA-008-1-SM1322211-800R.ab1
077416-BA-008-1-SM1322211-800R
CF 29 W.B3 Plate Name: 190523-6

KB 1.2 KB.bcp
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
TS:46 CRL:737 QV20+757

Signal: G 2173 A 2810 T 4320 C 5989 AvgSig: 3823



Inst Model/Name: 3730M/ABI 3730-25197-003

Pure Base QV: 93.0

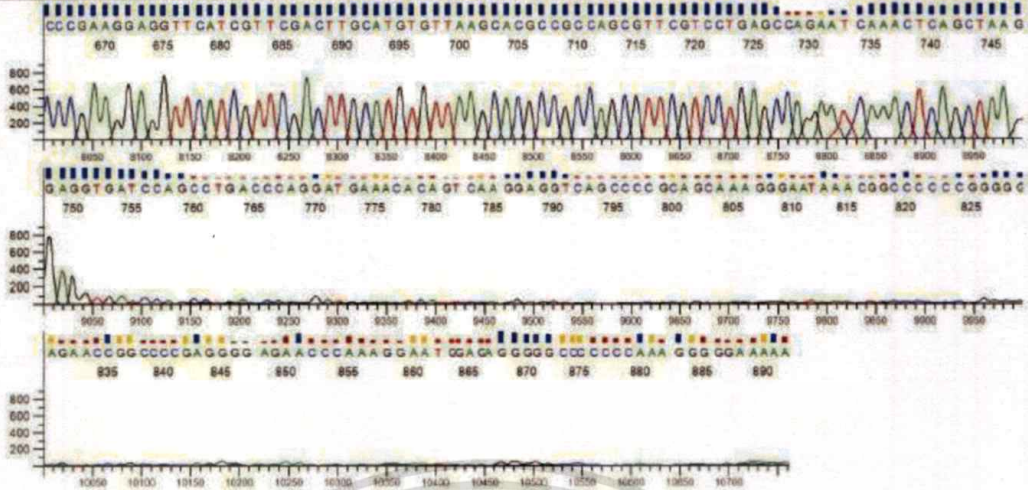
Printed on: 5/24/2019 09:20:06 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Mixed Base QV: 93.1

Electropherogram Data Page 2 of 3

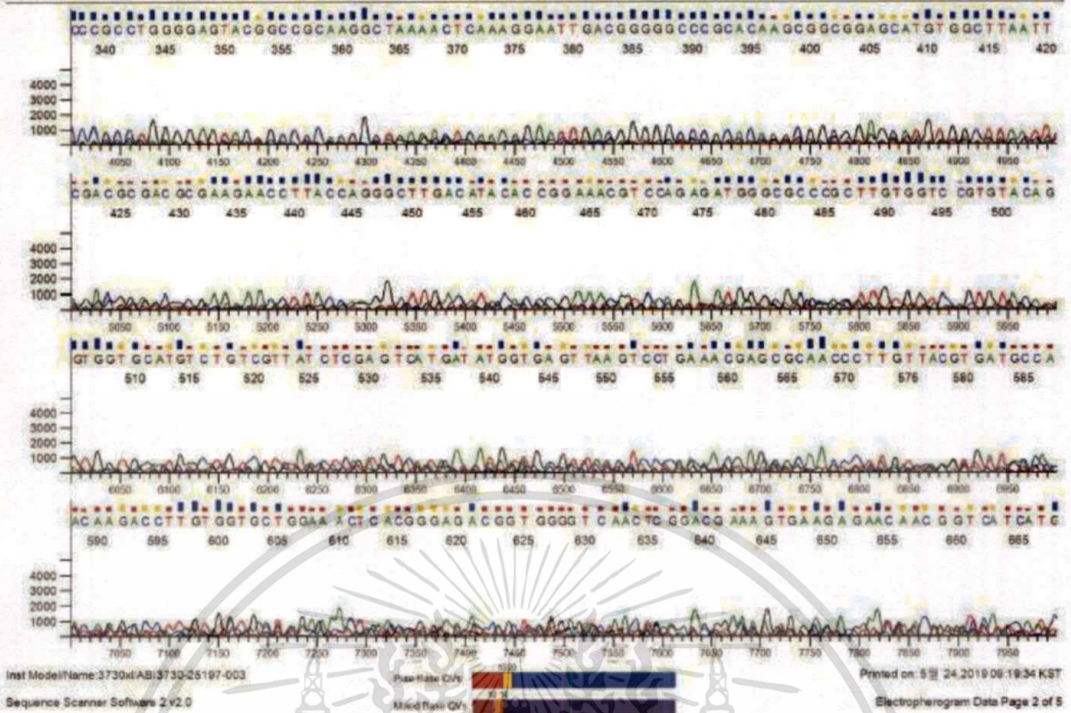
เอกสารนี้เป็นรูปที่ 7 กรัฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการการค้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ SM1322211 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 42 และ 749 นำไปใช้



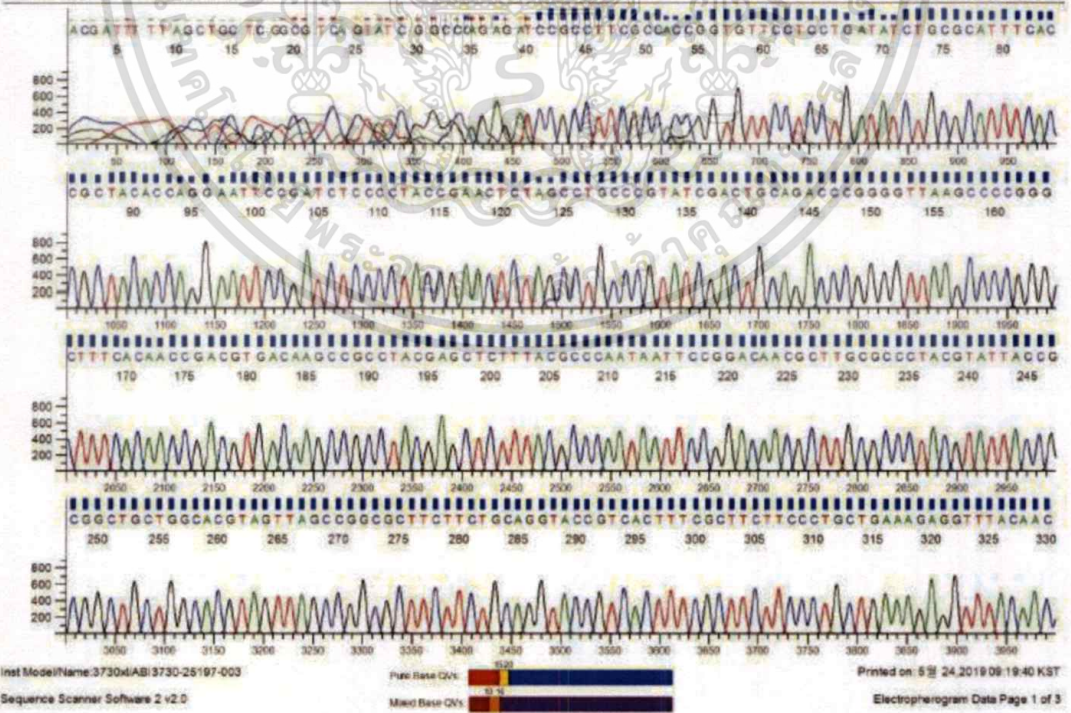
รูปที่ 7 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของ SM1322211 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 42 และ 749 (ต่อ)



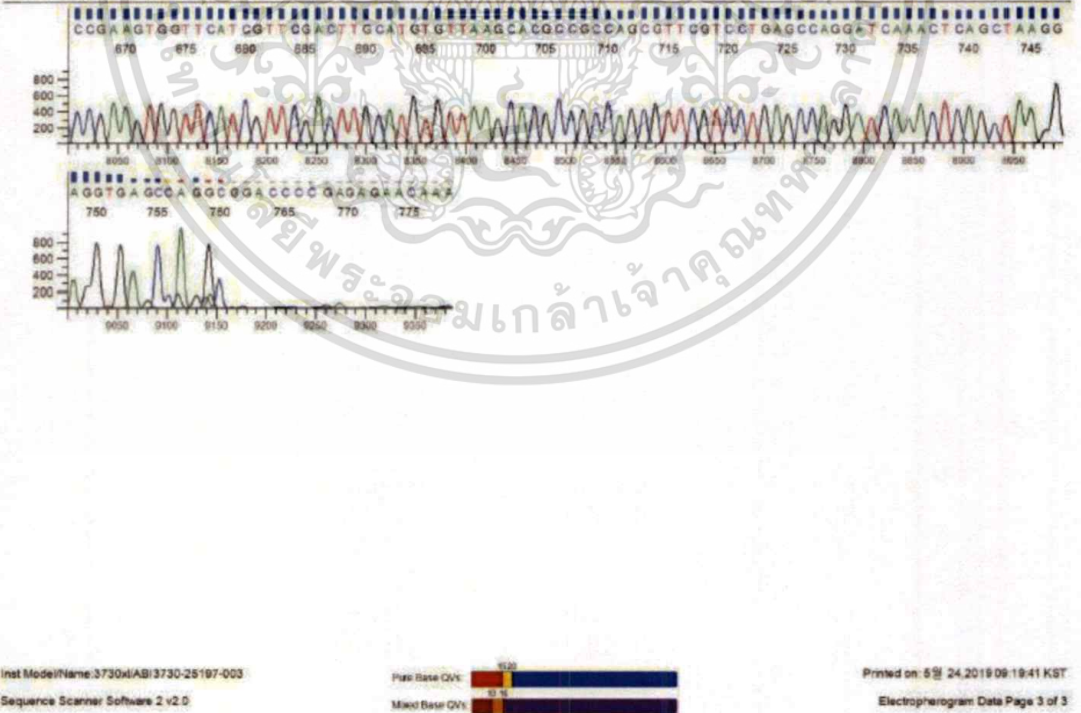
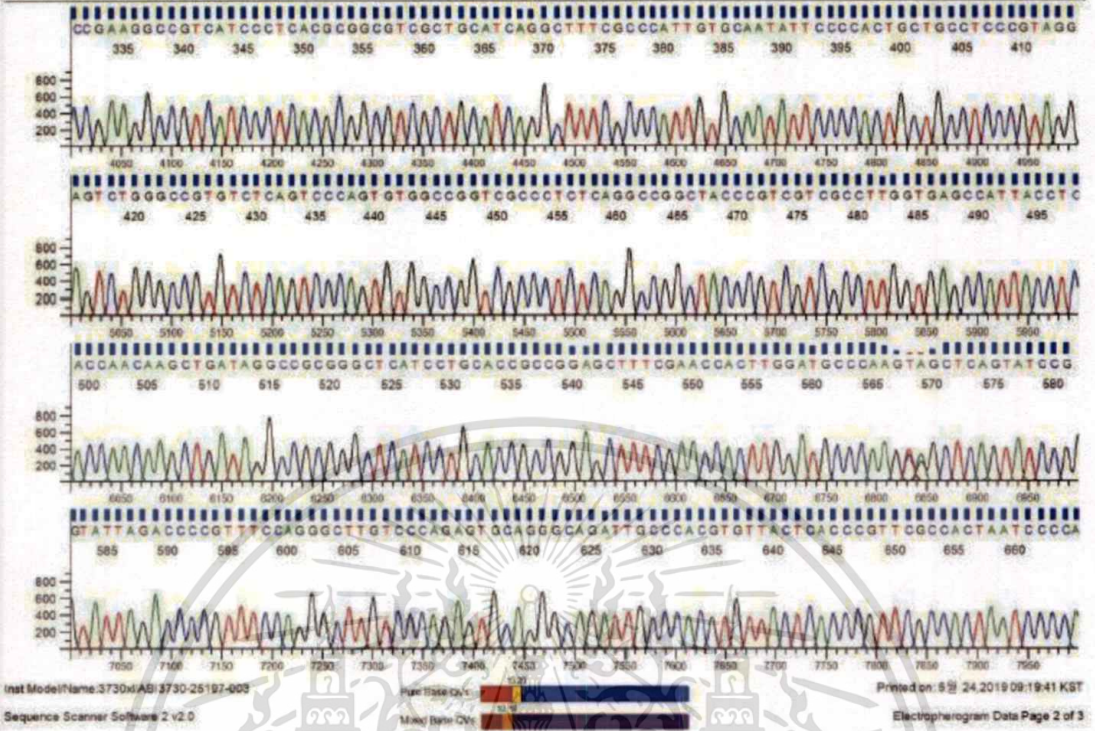
เอกสารรูปที่ 8 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในการวิเคราะห์ค่าไม่ว่าการณีใด ๆ ลำดับเบสของ SM0212103 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 90 และ 610 ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Forward โดยใช้ primer 518F ในการวิเคราะห์ ลำดับเบสของ SM0212103 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 90 และ 610 (ต่อ)

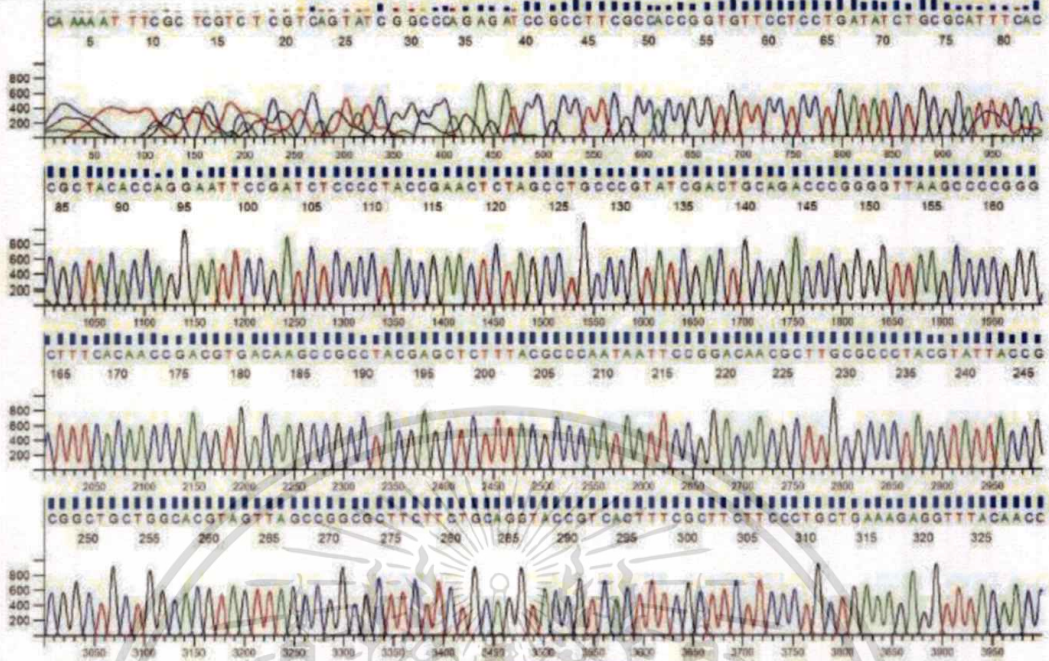


เอกสารนี้เป็นรูปที่ 9 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverse โดยใช้ primer 800R ในการวิเคราะห์ ลำดับเบสของ SM0212103 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 41 และ 760 นำไปใช้



เอกสารนี้เป็นรูปที่ 9 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการการคัด
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้นวิธีการลำดับเบสของ SM0212103 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 41 และที่ 760 (ต่อ) ไปใช้

Signal: G.862 A.865 T.1339 C.1906 AvgSig: 1248



Inst ModelName:3730x(ABI)3730-25197-003

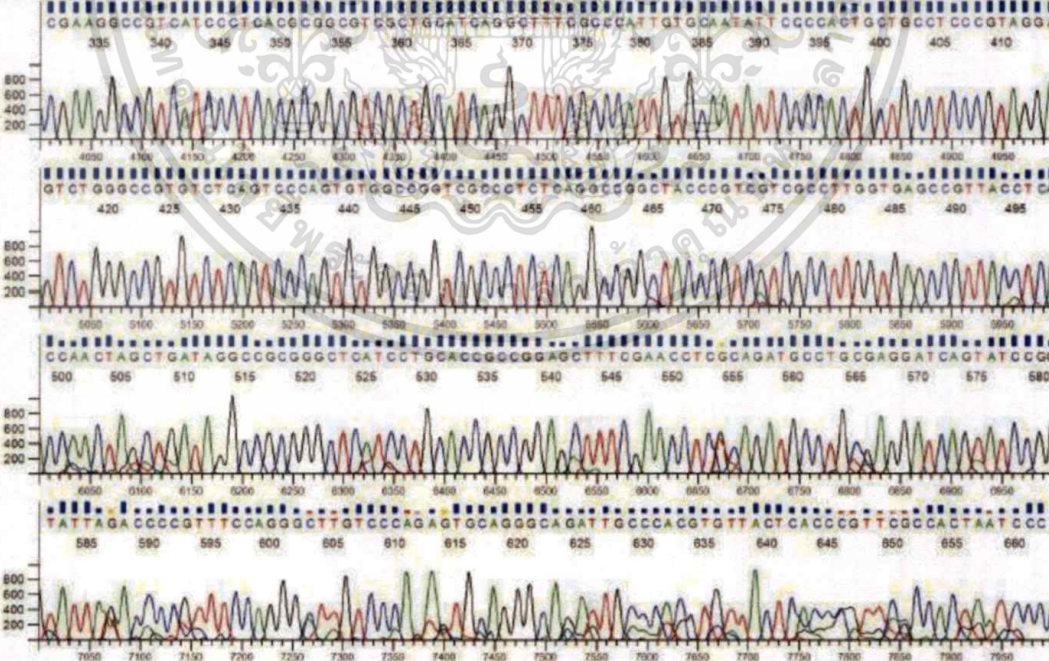


Printed on: 5 มิ 24 2019 09:20:26 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Electropherogram Data Page 1 of 3

Signal: G.862 A.865 T.1339 C.1906 AvgSig: 1248



Inst ModelName:3730x(ABI)3730-25197-003

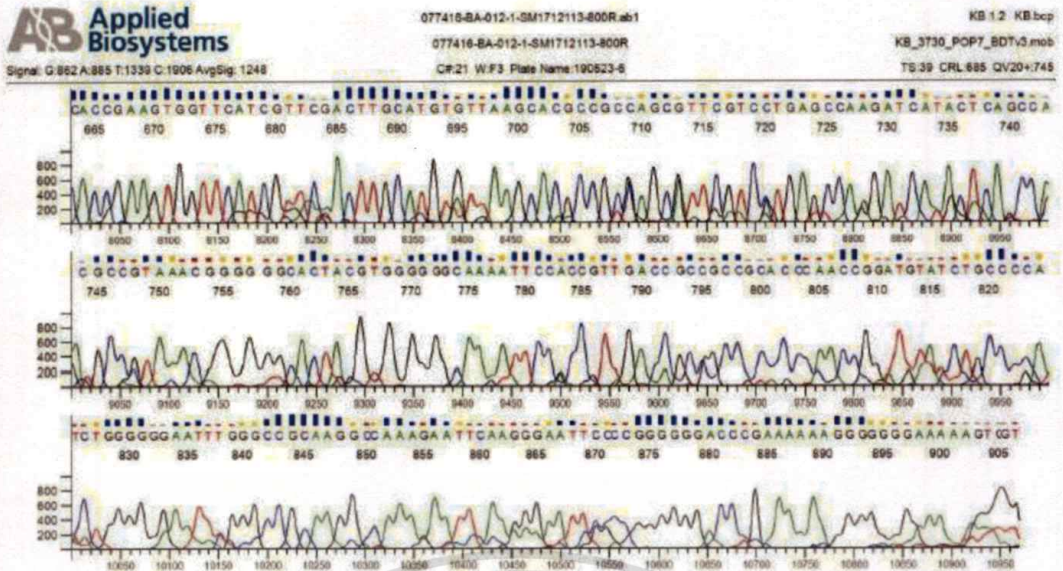


Printed on: 5 มิ 24 2019 09:20:26 KST

Sequence Scanner Software 2 v2.0

Electropherogram Data Page 2 of 3

เอกสารนี้รูปที่ 10 ที่กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverse โดยใช้ primer 800R ในการการค่า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ SM1712113 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 35 และ 884 ร่นไปใช้

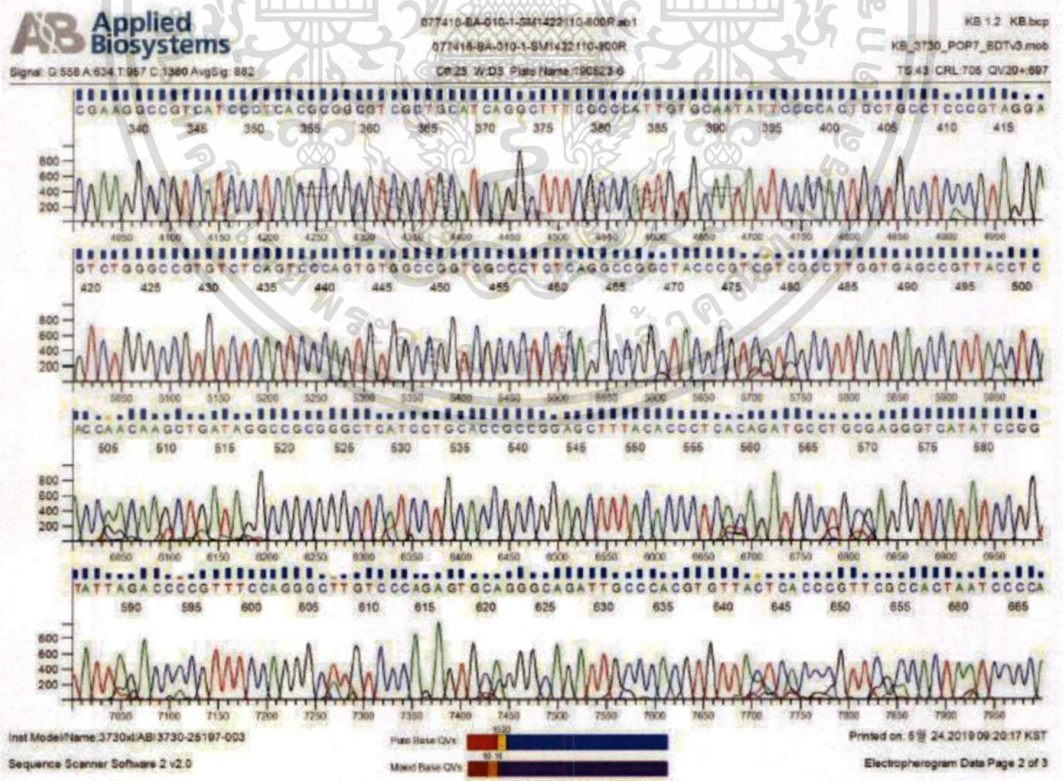


Inst ModelName:3730x(ABI)3730-25197-003
 Sequence Scanner Software 2 v2.0

Plate Date Q1%
 Mixed Base Q1%

Printed on: 8/24/2018 09:20:28 KST
 Electropherogram Data Page 3 of 3

รูปที่ 10 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของ SM1712113 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 35 และ 884 (ต่อ)



Inst ModelName:3730x(ABI)3730-25197-003
 Sequence Scanner Software 2 v2.0

Plate Date Q1%
 Mixed Base Q1%

Printed on: 8/24/2018 09:20:17 KST
 Electropherogram Data Page 2 of 3

เอกสารนี้เป็นรูปที่ 11 กราฟลำดับเบสในการ sequence ด้วยสาย Reverses โดยใช้ primer 800R ในการการคัดไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ SM1422110 โดยตัดลำดับเบสที่ตำแหน่ง 49 กับ 753 นำไปใช้