

การแยกและตรวจลักษณะของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท
จากรากพลูต่างและกล้วย

Isolation and characterization of endophytic
actinomycetes from *Epipremnum aureum*
and *Musa sapientum* root



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงข้อมูลของเอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ปีการศึกษา 2559

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC
ACTINOMYCETES FROM *EPIPREMNUM AUREUM*
AND *MUSA SAPIENTUM* ROOT



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
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ACADEMIC YEAR 2016

หัวข้อโครงการพิเศษ

การแยกและตรวจลักษณะของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากพลูด่าง และกล้วย

Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from *Epipremnum aureum* and *Musa sapientum* root

ชื่อนักศึกษา

นางสาวสิริรามล ต้นศิริ รหัสนักศึกษา 56050929
นางสาวสุชานาฏ เอนกนพรัตน์ รหัสนักศึกษา 56050935
นายอาณกร เรืองปราชญ์ รหัสนักศึกษา 56050954

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร.จิตติ ท้าวไฉ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท้าวไฉ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีหน้าที่แจ้งเตือนข้อผิดพลาดของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การแยกและตรวจลักษณะของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์ที่แยกจากรากพลูด่างและกล้วย		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสิริรามล	ตันศิริ	รหัสนักศึกษา 56050929
	นางสาวสุชานาฏ	เอนกนพรัตน์	รหัสนักศึกษา 56050935
	นายอาณกร	เรืองปราชญ์	รหัสนักศึกษา 56050954
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. จิตติ ท่าไว		

บทคัดย่อ

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์จำนวน 30 ไอโซเลต ถูกแยกจากรากพืช 2 ชนิด คือ พลูด่าง (*Epipremnum aureum*) 27 ไอโซเลต และกล้วย (*Musa sapientum*) 3 ไอโซเลต ที่เก็บจากเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร เชื้อเหล่านี้ถูกจัดกลุ่มด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 4 กลุ่ม จากนั้นเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์เหล่านี้เป็นสมาชิกของแอกติโนมัยสปีท์สกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora*

นอกจากนี้เชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวและกรองเพื่อแยกออกเป็นส่วนของเซลล์และส่วนของเหลว จากนั้นส่วนของเซลล์ถูกสกัดด้วยเมทานอลและส่วนของเหลวถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต สารสกัดหยาบจากส่วนน้ำหมักและเซลล์จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของไอโซเลต POR10-1 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับร้อยละ 95.87 แต่ไม่มีไอโซเลตใดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าไอโซเลต PRB2-1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากเชื่อนี้มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง 16S rRNA gene ในระดับต่ำ (98.53%) กับ *Streptomyces bryophytorum* NEAU-HZ10^T

เอกสารสำคัญ: พลูด่าง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ลำดับเบสช่วงยีน 16S rRNA, เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์, การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation and characterization of endophytic actinomycetes isolated from the roots of <i>Epipremnum aureum</i> and <i>Musa sapientum</i> .		
Students	Miss Siramon	Tansiri	Student ID 56050929
	Miss Suchanat	Aneknopparat	Student ID 56050935
	Mr. Arnakorn	Ruangprach	Student ID 56050954
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai		

Abstract

Thirty isolates of endophytic actinomycetes were isolated from the roots of golden pothos (*Epipremnum aureum*) (27 isolates) and banana (*Musa sapientum*) (3 isolates). These plants were collected from Nongchok, Bangkok. All actinomycete strains were grouped using a morphological characteristic into 4 groups. After that the representative isolate in each group was taxonomically determined using a procedure with the combination of morphological and the partial 16S rRNA gene sequence analyses. The results showed that the endophytic actinomycete strains were classified into 2 genera, *Streptomyces* and *Micromonospora*.

Furthermore, the representative isolate in each group was selected to cultivate in the broth medium. The fermentation broths were filtered to separate the cell and liquid part. The part of cells was then extracted using methanol while the liquid parts were extracted by ethylacetate. The crude extracts in the part of cell and fermentation part were evaluated for antimicrobial and antioxidant activities. The results revealed that the crude ethylacetate extract of isolate POR10-1 exhibited the best antioxidant activity because it showed the highest value of DPPH reduction (95.87%) at the concentration of 1000 µg/mL. In contrast, this extract showed no antimicrobial activity.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fortunately, in this study we found that isolate PRB2-1 is tentatively judged as a novel species of the genus *Streptomyces* because this isolate exhibits the low 16S rRNA gene sequence similarity value (98.53%) with *Streptomyces bryophytorum* NEAU-HZ10^T.

Keywords : 16S rRNA gene sequence, Antioxidant activity, Endophytic actinomycete, Golden pothos



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าโว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้คำแนะนำมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ และดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ ที่กรุณาตรวจทานและพิจารณาโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณ คุณนริศรา กำแก้ว และคุณธารินทร์ วาเต็ง นักศึกษาปริญญาโท ห้องปฏิบัติการ เชื้อแอกติโนมัยสีทที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ในคณะวิทยาศาสตร์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าและสมาชิกกลุ่มโครงการพิเศษทุกท่านที่ให้กำลังใจ มาโดยตลอด และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆ ท่านที่คอยอบรม สั่งสอน และให้ความรู้จนทำให้ สมาชิกกลุ่มมีความรู้ ความสามารถในการจัดทำโครงการพิเศษจนสำเร็จ

สิรามล

ตันศิริ

สุชานาฏ

เอนกนพรัตน์

อาณกร

เรืองปราชญ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แอคติโนแบคทีเรีย.....	3
2.1.1 เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท.....	4
2.1.2 สารปฏิชีวนะที่ใช้.....	5
2.1.3 สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	5
2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีท.....	6
2.3 หลักการทดสอบอนุกรมวิธานเบื้องต้น.....	7
2.3.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	7
2.3.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิกริยาพีซีอาร์.....	7
2.3.3 ขั้นตอนในการทำพีซีอาร์.....	7
2.4 หลักการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	8
2.4.1 อนุมูลอิสระและการต้านอนุมูลอิสระ.....	8
2.4.2 การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ.....	10
2.5 หลักการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion.....	11
2.6 ชีววิทยาของเชื้อที่นำมาทดสอบ.....	12
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	13
2.6.3 <i>Bacillus subtilis</i>	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.6.5 <i>Micrococcus luteus</i>	14
2.6.6 Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	14
2.6.7 <i>Candida albicans</i>	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1 เครื่องมือ.....	19
3.2 สารเคมี.....	19
3.3 การเก็บตัวอย่าง.....	21
3.4 การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท.....	21
3.5 การคัดเลือก การทำให้บริสุทธิ์ และการจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท.....	21
3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น.....	22
3.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	22
3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	22
3.8.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion.....	22
3.8.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	23
3.9 การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเบื้องต้น.....	24
3.9.1 สกัดดีเอ็นเอ.....	24
3.9.2 เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA.....	25
3.9.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์.....	26
3.9.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสายวิวัฒนาการ.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	27
4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท.....	27
4.2 ผลการคัดเลือก และจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท.....	28
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น.....	45
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	47
4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion.....	47
4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	47
4.5 ผลการระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเบื้องต้น.....	67

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	71
เอกสารอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	87
ภาคผนวก ง.....	91



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	25
3.2 วงจรพีซีอาร์.....	25
4.1 ชนิดรากพืช สถานที่เก็บ และไอโซเลตของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้.....	27
4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท บนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 14 วัน.....	43
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น.....	45
4.4 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PC1-1.....	47
4.5 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PRB2-1.....	49
4.6 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PP3-2.....	51
4.7 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PO4-1.....	53
4.8 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PO5-1.....	55
4.9 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PP8-1.....	57
4.10 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต POR10-1.....	59
4.11 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต BW5-2.....	61
4.12 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ จากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต BW13-1.....	63
4.13 ค่า % inhibition ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของแต่ละไอโซเลตเทียบกับสารมาตรฐาน BHT.....	65
4.14 สมการเส้นตรง และค่า IC ₅₀ ของสารสกัดหยาบส่วนน้ำหมัก และเซลล์ของแต่ละไอโซเลต.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะเส้นใยของแอกติโนมัยสีท.....	3
2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Micromonospora</i>	5
2.3 วงจรปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	8
2.4 สูตรโครงสร้างของ DPPH.....	11
2.5 Disc diffusion.....	12
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-1.....	28
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-2.....	29
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-3.....	29
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-4.....	30
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-5.....	30
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-6.....	31
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PC1-7.....	31
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PRB2-1.....	32
4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PRB2-2.....	32
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PRB2-3.....	33
4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP3-1.....	33
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP3-2.....	34
4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP3-3.....	34
4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PO4-1.....	35
4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PO5-1.....	35
4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-1.....	36
4.17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-2.....	36
4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-3.....	37
4.19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-4.....	37
4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-5.....	38
4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-6.....	38
4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-7.....	39
4.23 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PBL6-8.....	39
4.24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PO7-1.....	40
4.25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP8-1.....	40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.26 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP9-1.....	41
4.27 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต POR10-1.....	41
4.28 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BW5-2.....	42
4.29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BW13-1.....	42
4.30 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต BW13-2.....	43
4.31 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PC1-1.....	48
4.32 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PRB2-1.....	50
4.33 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PP3-2.....	52
4.34 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PO4-1.....	54
4.35 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PO5-1.....	56
4.36 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก PP8-1.....	58
4.37 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก POR10-1.....	60
4.38 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก BW5-2.....	62
4.39 กราฟแสดง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจาก BW13-1.....	64
4.40 ตำแหน่งของเชื้อ PRB2-1 บน phylogenetic tree.....	67
4.41 ตำแหน่งของเชื้อ BW13-1 บน phylogenetic tree.....	68
4.42 ตำแหน่งของเชื้อ PO4-1 บน phylogenetic tree.....	69
4.43 ตำแหน่งของเชื้อ PP8-1 บน phylogenetic tree.....	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีโรคอุบัติใหม่ และการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่เป็นปัญหาสำคัญของวงการสาธารณสุขทั่วโลก ทำให้การศึกษาค้นคว้าหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยแหล่งของสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มแอกติโนมัยซีต ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตได้หลายชนิด

แอกติโนมัยซีต (*actinomycetes*) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบนิเวศ โดยทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบ ทำให้ระบบนิเวศเกิดความสมดุล สามารถพบแอกติโนมัยซีตได้เป็นจำนวนมากในแหล่งต่างๆ เช่น บริเวณที่มีการเน่าเปื่อยของอินทรีย์วัตถุ บริเวณผิวน้ำดิน บริเวณแหล่งน้ำดินโคลน ดินไต้ น้ำ ดินที่อยู่ลึกลงไปใต้ผิวโลก ดินบริเวณเทือกเขา และยังสามารถพบได้ในพืช เช่น รากพืช ดินรอบรากพืช โดยแอกติโนมัยซีตที่พบในเนื้อเยื่อพืชนี้เรียกว่า เอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีต (*endophytic actinomycetes*) ซึ่งเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีตจะอาศัยร่วมกับพืชแบบส่งเสริมกัน (*synergistic*) โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเสริมความแข็งแรงของต้นพืช (Silke et al., 2012) ดังรายงานการวิจัยของ ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ที่ได้นำเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 3100 ที่สร้าง siderophore มาปลูกเข้าต้นข้าวและถั่วเขียวในระดับกระถางพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ทั้งความสูงและความยาวของต้นและราก รวมทั้งน้ำหนัก เมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ปลูกเชื้อ (อรินทิพย์ และคณะ, 2558) ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีตที่รู้จักกันดี คือ สามารถผลิตสารเมทาบอลไลท์ เช่น สารปฏิชีวนะและเอนไซม์ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยซีต (45%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดคือสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีตทั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990) และยังมีสารสีที่แอกติโนมัยซีตสามารถผลิตได้อีกด้วย ซึ่งสารสีที่แอกติโนมัยซีตผลิตนี้อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี แต่ยังมีรายงานการวิจัยการค้นพบสารชีวภาพจากแอกติโนมัยซีตค่อนข้างน้อย

ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีตที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ จากตัวอย่างรากพืชที่เก็บจากเขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพและมีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีตเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจทำให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ และนำไปสู่การค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางด้านการแพทย์และด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกและตรวจลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี จากรากพลูด่างและกล้วย
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อและตัวเซลล์ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการแยกเชื้อเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทจากรากพลูด่างและรากกล้วย โดยการฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิว (Surface sterilization)
2. ทำการตรวจลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากรากพลูด่างและรากกล้วย โดยทำการสกัด DNA เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และวิเคราะห์ลำดับเบส
3. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด หาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion และหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกและคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์ จากรากพลูด่างและรากกล้วย
2. สามารถระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทเบื้องต้น
3. ได้เชื้อเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระ

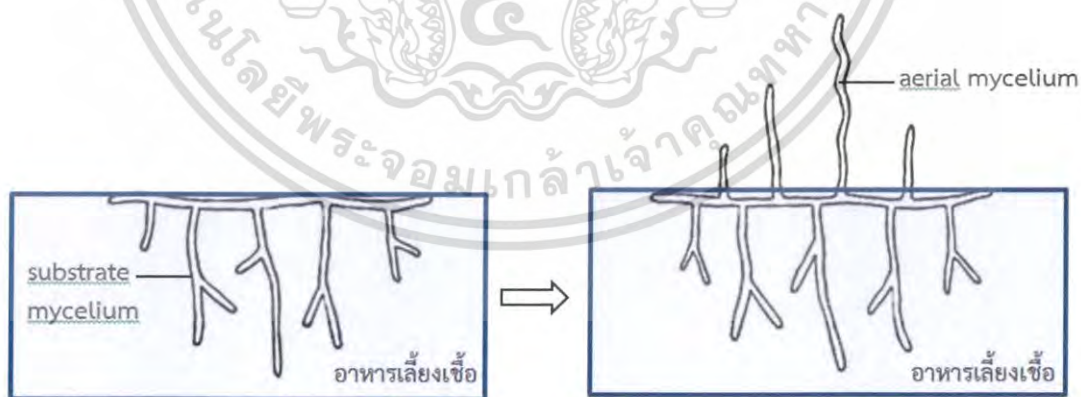
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียหรือแอคติโนมัยซีท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีน (guanine, G) และเบสไซโตซีน (cytosine, C) บนสายดีเอ็นเอในระดับสูง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ทั้งมีรูปร่างกลม (cocci) เป็นแท่ง (bacilli) และมีลักษณะเป็นสายเส้นคล้ายเชื้อรา คือ มีไมซีเลียมแตกกิ่งก้านและสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อราของแอคติโนแบคทีเรียคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต นอกจากนี้ขนาดของเส้นใยและสปอร์ของแอคติโนมัยซีทยังมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา โดยเฉลี่ยแล้วเส้นใยของแอคติโนมัยซีทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ในขณะที่เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 ถึง 8 ไมโครเมตร (Coyne, 1999) ส่วนการเจริญของเส้นใยมี 2 ประเภท คือ เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า substrate mycelium เส้นใยทั้งสองประเภทมักมีผนังกันและยึดยาวออกที่ส่วนปลายของเส้นใย โครงสร้างเส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์มีความหนาประมาณ 10 ถึง 20 นาโนเมตร ถัดมาเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ห่อหุ้มไซโทพลาสซึมที่ประกอบด้วยสารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ไรโบโซม ตลอดจนสารต่างๆ ที่สะสมภายในเซลล์ เช่น ไขมัน โพลีฟอสเฟต และโพลีแซคคาไรด์ (Vobis, 1997)



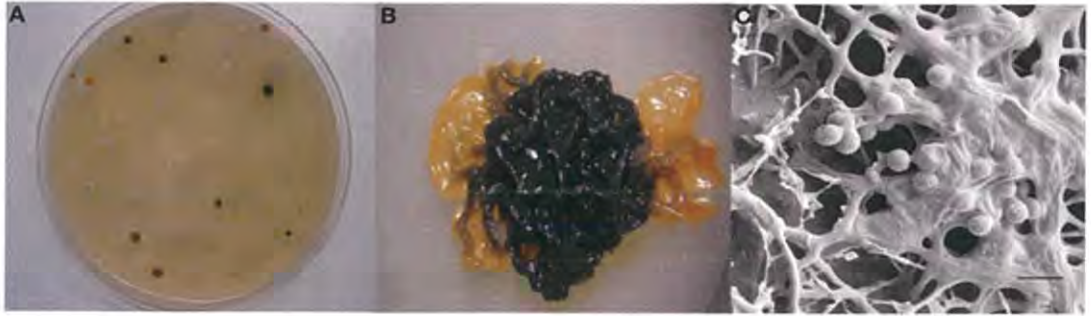
รูปที่ 2.1 ลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยซีท (<http://biology.ipst.ac.th>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีของแอสโคไมซีตมีลักษณะจำเพาะและแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยโคโลนีจะเกิดจากเส้นใยที่อัดกันแน่นเป็นก้อนแข็ง และมีเส้นใยบางส่วนฝังอยู่ในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีของแอสโคไมซีตหลายสกุลมักปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศทำให้เห็นว่ามีลักษณะคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมักมีสีเฉพาะในแต่ละสปีชีส์ บางสปีชีส์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) (Miyadoh, 1997) การสร้างโคโลนีของแอสโคไมซีตเริ่มจากการถ่ายขึ้นส่วนของเชื้อไม่ว่าจะเป็นสปอร์เดี่ยว (single spore) สปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ หรือเส้นใยที่เกิดการแตกหักไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง ขึ้นส่วนต่างๆนี้จะเริ่มงอกเส้นใยใหม่แทงลงไปใต้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร จากนั้นจะมีการสร้างเส้นใยอากาศ รวมตัวเป็นกลุ่มเส้นใย อัดตัวกันแน่นมีขอบเขตชัดเจน โดยทั่วไปแอสโคไมซีตมีการสร้างเส้นใยทั้งสองแบบ แต่อาจพบแอสโคไมซีตบางสกุลที่มีการสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เช่น สกุล *Micromonospora* เป็นต้น โคโลนีของแอสโคไมซีตมักมีการเจริญแบบเป็นวงกระจายออกจากจุดศูนย์กลางในแนวรัศมี อาจมีลักษณะนูน (raise) เรียบแบน (flat) บางครั้งอาจปกคลุมด้วยชั้นที่เหนียวคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีลักษณะแข็ง ความแข็งของโคโลนีอาจมีตั้งแต่ระดับที่อ่อนมากถึงเหลว ไปจนถึงโคโลนีที่แข็งมาก สีของโคโลนีมีตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาล ฟ้า เขียว และดำ ผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะเรียบ (smooth) เป็นสันนูน (ridged) เหี่ยวย่น (wrinkled) เป็นตุ่ม (granular) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ส่วนขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาพในการเจริญ โดยโคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ระดับมิลลิเมตรไปจนถึงระดับเซนติเมตร (Vobis, 1997) ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรียมาก แอสโคไมซีตที่เรียกเจริญได้อย่างช้าๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอสโคไมซีตที่เรียกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถนำมาใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกหมวดหมู่ของแอสโคไมซีตที่เรียกได้ (Martin, 1961)

2.1.1 เอนโดไฟติกแอสโคไมซีต

ภายในเนื้อเยื่อพืชที่สมบูรณ์แข็งแรง จะมีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ เรียกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า เอนโดไฟท์ ซึ่งเอนโดไฟท์เหล่านั้นจะอาศัยร่วมกับพืชแบบส่งเสริมกัน (synergistic) ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเสริมความแข็งแรงของต้นพืช (Silke และคณะ, 2012) โดยเชื้อเอนโดไฟท์บางกลุ่มจะสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิให้กับพืชช่วยให้เชื้อรารวมถึงแมลงไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (Taechowisan และ Lumyong, 2003) สามารถพบเชื้อในกลุ่มเอนโดไฟท์ได้ในพืชหลายชนิด โดยเอนโดไฟท์จะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสุขภาพดี (Tian และคณะ, 2004) และไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคหรือสาเหตุของโรคกับพืช (Hasegawa และคณะ, 2006) เช่น ในถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แตงกวา ปืทรูท และข้าว (Phetcharat และ Duangpaeng, 2012) เอนโดไฟติกแอสโคไมซีตสามารถย่อยสลายโลหะหนักและสลายอินทรีย์สารในพืช ดิน และน้ำได้ จึงเป็นตัวการสำคัญที่ช่วยทำให้มลพิษลดลง (Germaine และคณะ, 2006) ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Micromonospora*. (A) *Micromonosporae* ที่แยกจาก ปุ่มปมของพืชตระกูลถั่ว (B) โคลนีอายุ 14 วัน ที่สร้างสปอร์สีน้ำตาลดำ (C) สปอร์ที่ส่องด้วยกล้อง SEM (Carro, 2009 และ Alonso, 2010)

2.1.2 สารปฏิชีวนะที่ใช้

สารปฏิชีวนะที่ใส่ลงในอาหารแยกเชื้อนั้น มีหน้าที่ช่วยกำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกไป เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อได้ดีขึ้น เนื่องจากแอกติโนมัยซีทเป็น แบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญเติบโตช้า ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่นิยมใส่ในอาหารมักเป็นสารที่ใช้ในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ เช่น นิสเตติน (nystatin) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฮโคลเฮกซิเมด (cycloheximide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการลดการปนเปื้อนของเชื้อ แบคทีเรีย (จิตติ, 2557)

2.1.3 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ควรคำนึงถึงเพื่อให้เกิดผลสำเร็จในการ แยกเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลา (จิตติ, 2557)

อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทอยู่ที่ประมาณ 28-30 องศา เซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อรา แต่หากต้องการแยกแอกติโนมัยซีทใน กลุ่มที่ทนความร้อนสูง ควรใช้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป

ความเป็นกรด-ด่าง แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่ชอบอาศัยอยู่ในดินที่มีสภาพความเป็นกรดอ่อน (pH 5-6) ดังนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงควรปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ มากที่สุด แต่มีผลเสียคืออาจมีสารอาหารบางชนิดที่ไม่ทนกรดสูญเสียไปบ้าง วิธีการแก้ไขคือควร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้อยู่ในช่วง 6.8-7.3 ซึ่งจะไม่เป็นผลรบกวนต่อการเจริญของ เชื้อแอกติโนมัยซีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญเติบโตช้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มแอคติโนมัยสีทหายาก ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแยกเชื้อเหล่านี้อยู่ที่ประมาณ 21 วัน บางกลุ่มอาจใช้เวลามากกว่า 30 วันในการเจริญ ด้วยเหตุนี้จึงเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อรา ดังนั้นจึงควรรักษาความสะอาดของตู้บ่มเชื้อให้ดีและระหว่างการแยกเชื้อไม่ควรเปิดจานเพาะเชื้อบ่อยครั้ง

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีท

การพิสูจน์และจำแนกแอคติโนมัยสีทในระดับสปีชีส์อาศัยข้อมูลทางด้าน 16S rRNA หลักการจำแนกแบคทีเรียด้วยดีเอ็นเอเทคโนโลยี สามารถแบ่งกลุ่มเป็นสปีชีส์โดยใช้ผลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกด้วยลักษณะทางจີโนมป์ ด้วยมียีนเป้าหมายที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด คือ rRNA Operon ที่มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงในแบคทีเรีย ประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอ ชนิด 16S, 23S และ 5S (Barry และคณะ, 1991) เรียงลำดับตามการ transcription จาก 5' ไป 3' คือ 16S rRNA, spacer, tRNA, spacer, tRNA, spacer, 23S rRNA

ยีน 16S rRNA เป็นยีนที่มีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ได้รับการยอมรับโดยนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ (species) จีนัส (genera) และแฟมิลี (families) มีความเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (Gürtler และ Stanisich, 1996) แปรผันทางวิวัฒนาการน้อยมาก (Janda และ Abbott, 2007) มีฐานข้อมูลที่มีความแม่นยำเพื่อการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) มีรายงานความแตกต่างของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียกว่า 2,500 สปีชีส์ (Gürtler และ Stanisich, 1996) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA operon ที่สมบูรณ์บนฐานข้อมูล 144 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Barry และคณะ, 1991) ยีน 23S rRNA ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยกว่ายีน 16S rRNA เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ ประมาณ 3 กิโลเบส ฐานข้อมูลการศึกษาความแปรผันทางวิวัฒนาการของ 23S rRNA ยังไม่สมบูรณ์ ไม่เพียงพอในการเปรียบเทียบ ส่วนยีน 5S rRNA มีขนาดเล็ก ประมาณ 1.2 กิโลเบส ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียน้อยมาก เนื่องจากมีขนาดเล็กและนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ไม่ได้ (Gürtler และ Stanisich, 1996; Barry และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 หลักการทดสอบอนุกรมวิธานเบื้องต้น

2.3.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจอย่างจำเพาะเจาะจงได้ในปริมาณที่มากกว่าเดิมหลายล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว

เทคนิคพีซีอาร์อาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิต โดยเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส เทคนิคพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ร่วมกับสารเคมีและสารตั้งต้นที่สำคัญหลายชนิด

2.3.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิกริยาพีซีอาร์

1. DNA template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่
2. PCR buffer ประกอบด้วย Tris-Cl และ KCl pH 8.3
3. dNTP mix
4. Primer คือ นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ
5. $MgCl_2$ แมกนีเซียมไอออนจะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์เพื่อส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
6. Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการเชื่อมต่อกันของนิวคลีโอไทด์กับไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.3.3 ขั้นตอนในการทำพีซีอาร์

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนให้ไพรเมอร์สามารถเกาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ตรงบริเวณที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) ใช้อุณหภูมิช่วง 40-65 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนที่ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 72 องศาเซลเซียส

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler, PCR machine หรือ เครื่องพีซีอาร์) สามารถเพิ่มหรือลดอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดไว้และทำงานหมุนเวียนในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension ได้หลายรอบ เมื่อปฏิกริยาพีซีอาร์เสร็จสิ้นสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์จากการทำพีซีอาร์ตามที่ต้องการในปริมาณมาก ไม่นานนักให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำมัน และภาชนะที่บรรจุ แม้ปริมาณของโลหะหนักจะมีน้อย เช่น ระดับมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก็สามารถที่จะลดความคงตัวของน้ำมันได้ ซึ่งเมื่อกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยาให้หมดไป การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก็น้อยลงทำให้เกิดกลิ่นหืนลดน้อยลงไป โดยขั้นตอนของการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ก็เป็นขั้นตอนที่สามารถลดปริมาณของโลหะหนักเหล่านี้ได้ระดับหนึ่ง ดังนั้นน้ำมันที่ไม่ผ่านการทำให้เป็นน้ำมันบริสุทธิ์ก็ยังคงมีปริมาณของโลหะหนักอยู่สูง โดยโลหะหนัก เช่น เหล็ก จะมีผลไปเร่งอัตราการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันได้โดยตรง เนื่องจากเหล็กจะเป็นตัวรับไฮโดรเจนจากกรดไขมันทำให้เกิดเป็นแอลคิลฟรีแรดิคัล (alkyl free radical : R[•]) และเร่งการแตกตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide :ROOH) โดยเหล็กจะให้ อิเล็กตรอนกับไฮโดรเปอร์ออกไซด์แล้วเปลี่ยนเป็นเพอร์ออกซีแรดิคัล (peroxy radical : ROO[•]) และแอลคอกซีแรดิคัล (alkoxy radical : RO[•]) ตามลำดับ (Choe และ Min, 2006)

อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติทางเคมีที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ได้ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจึงเกิดการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตา และผิวพรรณ รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด โรคต่อกระฉก โรคความดันโลหิตสูง โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกายของเรามีกลไกป้องกันอนุมูลอิสระโดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) คาตาเลส (catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) เป็นต้น แต่การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัดในปัจจุบัน วงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ค้นพบว่า ในการป้องกันภาวะบกพร่องของร่างกายต่างๆ ที่เกิดจากการทำลายเซลล์ของอนุมูลอิสระนั้นควรได้รับสารเพื่อทำลายฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเรียกว่า สารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ (natural antioxidants) เช่น วิตามินซี วิตามินอี เป็นต้น และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เช่น บิวทิลเลทไฮดรอกซีเอนิโซล (butylated hydroxyanisole : BHA) บิวทิลเลทไฮดรอกซีโทลูอิน (butylated hydroxytoluene : BHT) แกลเลต (Gallate) เป็นต้น และมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต เอ็กเซอร์เซคควินบุนทรีย์ แอลกอฮอล์ ให้กลายเป็นสารที่ไม่อันตรายต่อเซลล์ ในร่างกายจะมีสารต้านออกซิเดชันเพื่อทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) ป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่จะก่อผลเสียต่อร่างกาย (สุวดี, 2549) แหล่งอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่

วิตามินเอ พบในตับหมู ตับไก่ ไข่ โดยเฉพาะไข่แดง น้ำมัน พืชผักที่มีสีเขียวเข้ม ผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น ผักตำลึง ผักกวางตุ้ง ผักบุ้ง ผักทอง มะม่วงสุก มะละกอสุก มะเขือเทศ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินซี พบมากในฝรั่ง ส้ม มะขามป้อม มะละกอสุก พริกชี้ฟ้าเขียว บร็อกโคลี ผักคะน้า ยอดสะเดา ใบปอ ผักหวาน ผักกาดเขียว

วิตามินอี พบในน้ำมันจากจมูกข้าวสาลี น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกคำฝอย เมล็ดทานตะวัน เมล็ดอัลมอนต์ จมูกข้าวสาลี

ซีลีเนียม พบมากในอาหารทะเล ปลาทูน่า เนื้อสัตว์ ตับ บะหมี่ ไข่ ปลา ขนบั้งโฮลวีต แคลโรทีนอยด์ (บีตาแคโรทีน ลูทีน และไลโคพีน) พบในผักที่มีสีเขียวเข้ม ผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น ผักตำลึง ผักกวางตุ้ง ผักบุ้ง ฟักทอง มะม่วงสุก มะละกอสุก มะเขือเทศ

พฤกษเคมีต่างๆ เช่น สารประกอบโพลีฟีนอลส์ (polyphenols) จากชาและสมุนไพรมานาน ชนิด ไอโซฟลาโวน (isoflavones) จากถั่วเหลือง เป็นต้น

2.4.2 การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เพราะเชื่อว่าสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านการเกิดออกซิเดชันได้ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญ เพื่อใช้บอกประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ หากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูง แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี (จุฬาลักษณ์, 2551) เช่น

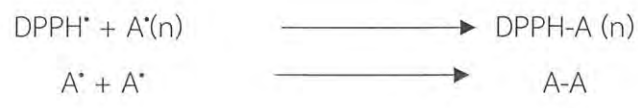
- 1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay
- 2) 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolorization assay
- 3) oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ซึ่ง DPPH เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH มีหลักการที่สารเคมี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) นี้เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความคงตัว เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย DPPH จะมีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยผสม DPPH* และสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ (AH) ในหลอดทดลอง ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันดังสมการนี้

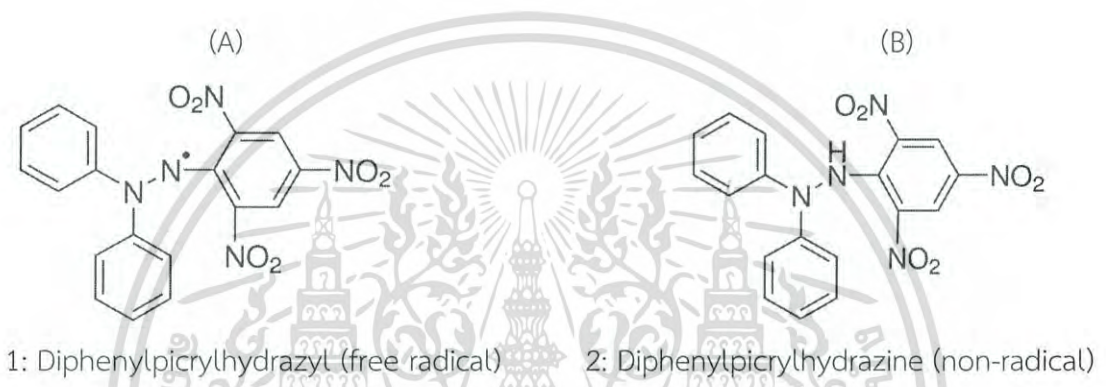


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระใหม่ที่เกิดขึ้น (A*) จะทำปฏิกิริยาต่อไป (radical-radical interaction) โดยกระบวนการ radical disproportionation จนกระทั่งได้เป็นโมเลกุลที่มีความคงตัว (A-A) ดังสมการ



เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH* ได้รับโปรตอนจากสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ สารละลาย DPPH ก็จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรลดลง



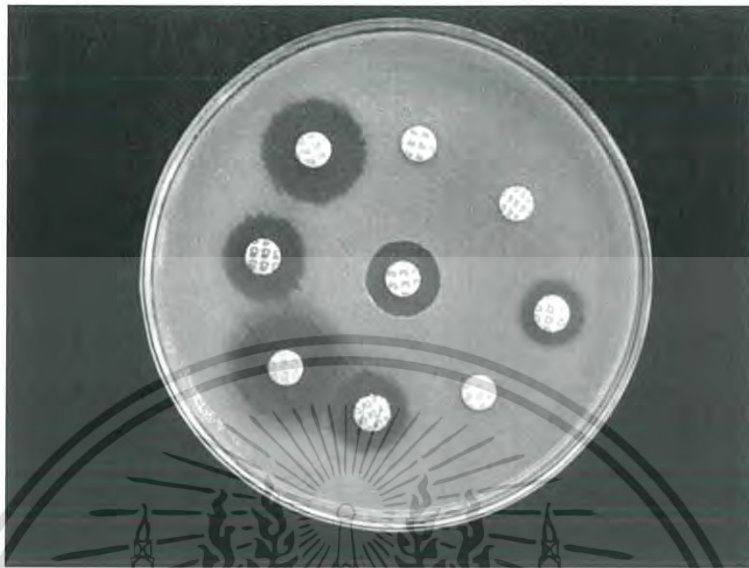
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระ (A) และไม่เป็นอนุมูลอิสระ (B) (Molyneux, 2004)

2.5 หลักการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

วิธี Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่แพร่หลายที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ

หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดหยาบที่มีในแผ่นดิสก์ (disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใส ไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่นดิสก์ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของบริเวณที่ถูกยับยั้ง วิธีการนี้ใช้ในการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดหยาบในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้วยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดหยาบ ความสามารถไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการละลายหรือ ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดหยาบ อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ



รูปที่ 2.5 Disc diffusion (<https://upload.wikimedia.org>)

การตรวจผลเมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมงแล้ว ให้วัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของแผ่นดิสก์ จากนั้นบันทึกหน่วยเป็น มิลลิเมตร (ขอบที่วัดต้องเป็นขอบที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบางๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ไม่มากพอจะยับยั้งการเจริญของเชื้อได้)

2.6 ชีววิทยาของเชื้อที่นำมาทดสอบ

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่ มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แต่เจริญได้ดีกว่าในที่มีออกซิเจน เชื้อจะเจริญได้ในช่วง อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบ เรียบ เป็นเงา สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองที่เรียกว่า ไตรเทอเพินอย แครโรทีนอย (triterpenoid carotenoids) ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเหลืองทอง การสร้างรงควัตถุของเชื้อจะเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อบ่มไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่เชื้อจะไม่สร้างรงควัตถุในที่ที่ไม่มี ออกซิเจนหรือในอาหารเหลว นอกจากนั้น *Staphylococcus aureus* เกือบทุกสายพันธุ์สามารถ สลายเม็ดเลือดแดงได้ (β -hemolytic zone) รอบๆโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus สามารถย่อยน้ำตาลได้หลายชนิด โดยจะย่อยได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจน (respiration) และการหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจน (fermentation) *Staphylococcus aureus* จะทนความแห้งและความร้อนได้ดี (50 องศาเซลเซียส 30 นาที) นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 15 โซเดียมคลอไรด์) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียทั่วไป (จินตนา, 2549)

2.6.2 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียทรงท่อน กว้าง 0.4-0.7 ไมโครเมตร ยาว 2-4 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงธรรมดา และเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนก็สามารถเจริญได้ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนไหวได้เพราะมีขนรอบตัว (จิราพร, 2545) บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี แต่ถ้าเลี้ยงในอาหาร differential media เช่น MacConkey agar จะได้โคโลนีสีแดงชมพูขนาดใหญ่ เนื่องจากการหมักแล็กโทส หรือเลี้ยงในอาหาร eosin methylene blue agar โคโลนีจะเป็นมันวาวคล้ายโลหะ มีสายพันธุ์ที่หมักแล็กโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือด บางสายพันธุ์มีการสลายเม็ดเลือดแดงแบบปิต้าอีโมไลซิส *Escherichia coli* เจริญได้ในอุณหภูมิช่วง 15-45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที (รัตนารักษ์ และคณะ, 2548)

Escherichia coli มีระยะฟักตัว 12-72 ชั่วโมง ปกติเชื่อว่าจะอยู่ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ ถ้าออกมาอยู่ข้างนอกลำไส้ นอกจากจะทำให้เกิดโรคท้องร่วงแล้วยังทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ ในผู้หญิงพบว่าปากช่องคลอดจะมี *Escherichia coli* อยู่มาก ถ้าเชื้อแพร่เข้าสู่ระบบกระแสโลหิตอาจทำให้เกิดโรคในอวัยวะอื่นได้ เช่น ปอดอักเสบ ฝีในตับ ถุงน้ำดีอักเสบ แต่สามารถรักษาได้ด้วยยานีโอไมซิน (neomycin) หรือโคลิสติน (colistin) (จิราพร, 2545)

2.6.3 *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเซลล์เป็นแท่ง เจริญในที่ที่มีออกซิเจน สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและสามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *Bacillus subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker และ Cook, 1974) นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman และ Rossa, 1994) ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000) ารค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus subtilis สามารถก่อโรคปอดบวมชนิดรุนแรง การติดเชื้อในกระแสเลือด โรค ลื่นหัวใจอักเสบ การติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัด และโรคท้องร่วง

2.6.4 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ทรงกลมและเจริญได้ในที่มีออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้ แฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยที่นอนใน โรงพยาบาลและใส่สายสวนปัสสาวะไว้ และเจริญได้ดีในทุกสภาวะแม้แต่น้ำยาฆ่าเชื้อที่เจือจาง ต้อยต้านแบคทีเรีย มักก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา สร้างเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายสารอาหารหลายชนิด เช่น protease, amylase อาศัยในดินและในน้ำ ในลำไส้คนปกติพบประมาณร้อยละ 10 บางครั้งพบในน้ำลายหรือผิวหนังที่เปื่อยขึ้น เชื้อทนต่อสบู สารฆ่าเชื้อหลายชนิด ยา ความร้อน ความเย็น ความแห้ง จึงอยู่ได้นานในสภาวะแวดล้อมทั่วไป โดยมากโรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas aeruginosa* มักไม่พบในคนที่มียาการปกติแต่จะพบใน คนที่มีอาการเจ็บป่วยอยู่ก่อนแล้ว เมื่อ *Pseudomonas aeruginosa* เข้าสู่ร่างกายจะเข้าไป เจริญเติบโตในเนื้อเยื่อ สร้าง endotoxin และเอนไซม์หลายชนิด การติดเชื้อที่แผลไฟไหม้จะเห็น หนองสีเขียวทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบโดยเริ่มจากมีไข้ ปวดศีรษะจนมีอาการที่ตรวจพบ ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถติดเชื้อในกระแสเลือดได้ด้วย (จินตนา, 2549)

2.6.5 *Micrococcus luteus*

เป็นแบคทีเรียขนาดเล็ก มีรูปร่างกลมและมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นกลุ่ม ต้องอาศัย ออกซิเจน (Oxidative) จึงจะสามารถใช้น้ำตาลได้ สามารถเพาะแยกได้จากสภาวะแวดล้อมทั่วไปตาม ผิวหนังคนและสัตว์ มีอยู่บ่อยๆว่ามันสามารถแพร่กระจายได้ในบรรยากาศ จากการที่พบปนเปื้อนบน อาหารเลี้ยงเชื้อ มีวงจรชีวิตอิสระ ไม่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและในสัตว์ (ชาญณรงค์, 2548)

2.6.6 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน หรือยาปฏิชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่ ต่างไปจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั่วไปที่สามารถกำจัดได้ด้วยยาปฏิชีวนะ โดย *Staphylococcus aureus* พบได้ทั่วไปบริเวณผิวหนังและโพรงจมูกของมนุษย์ โดยที่ไม่ก่อให้เกิด ปัญหาใดๆ จึงเป็นเรื่องปกติที่มนุษย์จะเป็น “พาหะ” ของแบคทีเรียประเภทนี้ โดยไม่มีอาการป่วย แต่ ทั้งนี้ *Staphylococcus aureus* สามารถก่อให้เกิดอาการติดเชื้อและต้องได้รับการรักษา เช่น อาการปวดแสบ, ผิวหนังอักเสบ, ฝี, แผลพุพอง (ฝีดาษ) แต่หลังจากมนุษย์สร้างยาปฏิชีวนะขึ้นมา *Staphylococcus aureus* ก็เริ่มมีการดื้อยา จนในช่วง 1970 ก็ได้มีการค้นพบว่าเชื้อนี้ดื้อต่อยา เอกสารปฏิชีวนะและได้ให้ชื่อว่า MRSA ซึ่งในสมัยนั้นมีความน่ากลัวมากเนื่องจากถ้าเมื่อมันก่อโรคหรือทำให้ค่า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ติดเชื้อไปแล้ว มนุษย์ยังไม่มียาที่จะกำจัดเชื้อนี้ได้ ดังนั้นการดูแลผู้ที่ติดเชื้อนี้ คือการดูแลด้านอื่นๆที่ไม่ใช่ยา ไม่ว่าจะดูแลเรื่องการทำให้แผลแห้งหรือการรักษาแบบประคับประคอง

ในปัจจุบันมียาที่พอจะใช้ได้ชนิดหนึ่งคือ Vancomycin (ข้อด้อยคือ ต้องฉีด กำจัดเชื้อได้ช้า ผลข้างเคียงสูง และแพง) แต่เชื้อก็ดื้อจนจนได้เชื้อกลุ่มใหม่ที่เรียกว่า VRSA ซึ่งดื้อต่อยาตัวนี้ไปอีก ดังนั้นการป้องกันที่ดีที่สุดคือ ป้องกันไม่ให้เกิดเชื้อ MRSA ขึ้นมาตั้งแต่ต้น

2.6.7 *Candida albicans*

มีรูปร่างเป็นเซลล์กลมๆหรือที่เรียกว่า ยีสต์ โดยปกติแล้วจะพบเป็นเชื้อประจำถิ่นของร่างกายมนุษย์ หมายถึงเชื้อที่อาศัยอยู่กับร่างกายโดยไม่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งมักพบเชื้อนี้อยู่บริเวณผิวหนัง เยื่อช่องปาก และเยื่อช่องคลอด แต่ถ้าร่างกายมีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคต่ำ ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานๆ เป็นโรคเบาหวาน โรคเอดส์ หรือมีภาวะอับชื้นบริเวณอวัยวะเพศเป็นเวลานานๆ ก็จะทำให้เชื้อรามีปริมาณมากขึ้นจนก่อโรค (วิชัย, 2014)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lee และคณะ (2008) ได้ทำการแยกแอมโมเนียโตฟิติกแอคติโนมัยสิส เพื่อให้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ ในการต้านโรครากบวมในผักกาดขาวที่เกิดจาก *Plasmodiophora brassicae* โดยแยกได้ 81 ไอโซเลต จากการพอกฆ่าเชื้อราบริเวณพื้นผิว และใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rDNA ทำให้ระบุได้ว่ามีแอคติโนมัยแบคทีเรีย 8 สกุล ซึ่งที่พบมากที่สุดคือ *Microbispora* 67%, *Streptomyces* 12% และ *Micromonospora* 11% ผลคือพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. brassicae*

สุจรรรยา (2556) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิสจากพืชสมุนไพร 4 ชนิด โดยวิธีการพอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิว (Surface sterile) และแยกเชื้อบนอาหาร Humic-acid vitamin (HV) agar ได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่ามี 14 ไอโซเลตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* และ *Serratia marcescens*) และยีสต์ (*Candida albicans*) โดยมี 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด คือ BO-03, BO-07, BO-08 และ AL-03 ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อดังกล่าวด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ นำสารสกัดหยาบมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ทดสอบการต้านเซลล์มะเร็ง HeLa, HepG2 และ Huh 7 และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ด้วยวิธี MTT assay และนำสารสกัดหยาบ BO-07 มาทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ด้วยวิธี Bioautography

ไม่พบว่าสามารถต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ทำการจัดจำแนกเชื้อ แอคติโนมัยสิสไอโซเลต

BO-07 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบก้านชูสปอร์เป็นสายเดี่ยว สปอร์รูปไข่ผิวเรียบต่อกัน เป็นสายยาวโค้งงอและจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยการไฮโดรไลซ์เซลล์ พบ 2,6 diaminopimelic acid (DAP) ชนิด LL-diaminopimelic acid เมื่อนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเชื้อ BO-07 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจากการวิเคราะห์โดยการ ทำ phylogenetic tree ของ 16S rDNA พบว่าเชื้อ BO-07 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces daghestanicus* ถึง 99.73%

Janete และคณะ (1999) ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากใบและรากของข้าวโพดด้วยการพอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ซึ่งแยกได้จากใบ 31 ไอโซเลต และราก 22 ไอโซเลต ซึ่งพบสกุล *Microbispora* มากที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces* และ *Streptosporangium* จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดมี 43.4% ที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหรือยีสต์ และต้านได้ทั้งแบคทีเรียและยีสต์

Lixiang และคณะ (2004) แยกแอคติโนมัยสีทจากในใบ และรากของกล้วยที่สมบูรณ์และเหี่ยวเฉาได้ทั้งหมด 242 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* โดย *Streptomyces griseorubiginosus* เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ในใบกล้วยที่เหี่ยวเฉามีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทเพิ่มขึ้นกว่าในใบที่สมบูรณ์ ซึ่งคล้ายกันกับที่พบ ความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในรากที่เน่าเปื่อยมากกว่าในรากที่สมบูรณ์แข็งแรง เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้าน *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* พบว่าแอคติโนมัยสีทในรากกล้วยที่สมบูรณ์แข็งแรงมีฤทธิ์ในการต้าน *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ได้สูงกว่าในรากที่เน่าเปื่อย แต่ในใบกลับไม่มีความแตกต่างกัน

Lixiang และคณะ (2005) แยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากรากกล้วยด้วยวิธีการพอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวได้ 131 ไอโซเลต ซึ่งมี 99 ไอโซเลตอยู่ในสกุล *Streptomyces* 28 ไอโซเลตอยู่ในสกุล *Streptoverticillium* และ 2 ไอโซเลตอยู่ในสกุล *Streptosporangium* spp. ส่วนอีก 2 ไอโซเลตยังไม่สามารถระบุได้ ประมาณ 18.3% ของไอโซเลตทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ได้

Waheeda และ Shyam (2017) ทำการแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร 3 ชนิดคือ โหระพา โสมอินเดีย ระย่อมพินเก้ โดยทำการประเมินประสิทธิภาพวิธีพอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวระหว่างวิธีดั้งเดิมกับวิธีใหม่และอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ในการแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท วิธีการพอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิววิธีใหม่ที่มีการใช้แคลเซียมไฮโปคลอไรท์, โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และโซเดียมเฮกซ์ มีประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์อ็อพอร์ท และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดที่ใช้ในการแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทก็คือ starch casein agar (SCA) และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-4 ในการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยแยกได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลต จากนั้นจัดกลุ่มเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ด้วยการดูลักษณะโคโลนีทั้งสี การสร้างรงควัตถุ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร และลักษณะของสปอร์ จากนั้นจึงทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สำหรับไอโซเลตที่พบว่ามียูทิลิตี้ในการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion อีกครั้งโดยใช้สารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตท และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพีโนไทป์ พบว่ามี 12 ไอโซเลตที่ถูกระบุว่าเป็น *Streptomyces* spp.

วิสาตรี (2558) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบยีน 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) ที่แยกได้จาก *Acinetobacter baumannii* ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (amplicon) ของ ISR จาก *A. baumannii* สายพันธุ์ดี้อย่าและไม่ดีอย่าจำนวน 15 ไอโซเลต มีขนาด 1,230 คู่เบส จากการพยากรณ์จาก *A. baumannii* สายพันธุ์ต้นแบบที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสชนิดอื่น พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของ ISR มีขนาดระหว่าง 840-1,050 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* สายพันธุ์ดี้อย่าและไม่ดี้อย่ามาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่า *A. baumannii* ทั้ง 15 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. baumannii* ATCC 17978 ถึง 98% และจากแผนภูมิมิวิวัฒนาการพบว่า *A. baumannii* สายพันธุ์ดี้อย่าและไม่ดี้อย่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันประมาณ 98-99 % ดังนั้นการศึกษารูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ของ ISR ด้วยวิธีพีซีอาร์ อาจจะสามารถนำไปจำแนก *A. baumannii* จากสิ่งส่งตรวจในระดับสปีชีส์ได้

Singh และ Dubey (2558) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Property) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาหรือไม่ โดยในงานวิจัยฉบับนี้ได้ระบุว่าไอโซเลต SORS64b, SORS124, AGRS16, AGLS2 และ AGRS19 เป็นไอโซเลตที่แยกได้จากพืชตระกูลกล้วยไม้ มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (Tanvir, 2557) และไอโซเลตดังกล่าวมียูทิลิตี้ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ช่วยให้พืชทนต่อภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress) และยังสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในมนุษย์ได้อีกด้วย (Babu และคณะ, 2557) และยังพบสารประกอบประเภทฟีนอลิก 2-Allyloxyphenol สกัดได้จาก *Streptomyces* sp. มียูทิลิตี้ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Zhang และคณะ, 2555 และ Dong และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่พบในต้นแพงพวยฝรั่ง (*Cantharanthus roseus*) มียูทิลิตี้ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีอีกด้วย (Jasmine และคณะ, 2556)

รงชัย และคณะ (2559) ได้ทำการแยกเชื้อเอนโดไฟติกจากต้นหมอน้อย และได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางเคมี และลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต

VE2 อยู่ในสกุล *Streptomyces* จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตทมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion และต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีฤทธิ์ในการต้าน *Salmonella typhi* ATCC19430 และ *Bacillus cereus* ATCC7064 มีค่า MIC ที่ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าในการต้านอนุมูลอิสระ SC_{50} 58.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Marquez และคณะ (2010) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากรากของต้นมะเขือเทศแมกซิกกัน (*Physalis ixocarpa*) โดยนำรากของพืชมาล้างทำความสะอาดเศษดินออก จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร้อยละ 2.5 (2.5% sodium hypochlorite) เป็นเวลา 5 นาที เสร็จแล้วล้างอีกครั้งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 นาน 30 วินาที และสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 5 ครั้ง โดยการตรวจสอบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อว่าสมบูรณ์หรือไม่นั้น ให้นำน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้างแล้วขึ้นพืชมาทำให้กระจาย (Spread) ลงบนเพลทอาหาร TSA, Luria Bertani (LB) และ Peptone Yeast extract (PY) medium จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อตรวจดูการเจริญของแบคทีเรีย การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน และรากพืช โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) นั้น ใช้ไพรเมอร์ Fdl ซึ่งเป็น universal bacterial primer มีลำดับเบสคือ 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (forward) และ Rdl ที่มีลำดับเบสคือ 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (reverse) ซึ่งเหมือนกับตำแหน่งที่ 8 ถึง 28 และ 1,526 ถึง 1,542 จากยีน 16S rDNA ของ *E.coli* ตามลำดับ สำหรับปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอน ดังนี้ คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ 30 รอบปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ final extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Automatic pipette)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. เลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 40 เท่า (Long working distance objective lens)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
6. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
7. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Centrifuge)
10. เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)
11. เดซิเคเตอร์ (Decicator)
12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler)
13. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometer)
14. เครื่องรันเจล (Gel electrophoresis)
15. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
17. เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (Dry bath)
18. เครื่องวัดปฏิกิริยาของสารบนไมโครเพลท (Microplate reader)
19. โกร่งสำหรับบด
20. ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
20. ตู้แช่เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

1. วุ้น (Agar)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
3. สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
4. กลูโคส (Glucose)
5. แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)
6. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับอาจารย์ผู้สอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เคซีนโซเดียมคาซิเนต (Casein sodium caseinate)
8. ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)
9. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
11. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
12. ไอรอนซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
13. สารปฏิชีวนะนิสเตติน (Nystatin)
14. Casein peptone
15. Soy peptone
16. Dextrose
17. น้ำกลั่น (Distilled water)
18. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95
19. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70
20. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (0.01% SDS)
21. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 (3% NaClO)
22. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% $NaHCO_3$)
23. บัฟเฟอร์ TE (TE buffer)
24. ไลโซไซม์ (Lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
25. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% SDS)
26. สารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม (Phenol - Chloroform)
27. เอทานอลที่เย็นจัด (Absolute ethanol)
28. Saline sodium citrate (SSC)
29. ไพรเมอร์ 9F ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์
30. ไพรเมอร์ 1541R ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์
31. ไดนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP)
32. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
33. น้ำปราศจากไอออน (Milli Q water)
34. บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)
35. สีย้อมดีเอ็นเอ (6X DNA Loading Dye)
36. SYBR® Safe DNA Gel Stain
37. เอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น กรุณาติดต่อเจ้าหน้าที่ขอเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

38. เมทานอล (Methanol)
39. 1-Kb Plus DNA Ladder

3.3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างรากพืช 2 ชนิด ได้แก่ พลูต้าง (*Epipremnum aureum*) และกล้วย (*Musa sapientum*) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท โดยนำตัวอย่างรากพืชทั้ง 2 ชนิด มาล้างทำความสะอาดคราบดินออกจนหมด จากนั้นนำไปแยกเชื้อด้วยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้านนอก (Surface sterilization)

3.4 การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

นำตัวอย่างรากพืชมาแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท โดยใช้การฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้านนอกของรากพลูต้างและกล้วย ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ลามินาร์ (Laminar) เริ่มจากนำตัวอย่างรากพืชที่ทำความสะอาดแล้วมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 1-2 เซนติเมตร แล้วซบบนกระดาษทิชชูให้แห้ง จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 10 นาที แล้วซบบนกระดาษทิชชูให้แห้ง ต่อด้วยฟอกฆ่าเชื้อในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที แล้วซบบนกระดาษทิชชูให้แห้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดยต้องเก็บน้ำกลั่นที่ล้างครั้งสุดท้ายไว้เป็น control ในขั้นตอน spread plate สุดท้ายนำตัวอย่างมาฟอกในโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต หรือ ปูนขาว ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราแล้วซบบนกระดาษทิชชูให้แห้ง

นำตัวอย่างรากพืชที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งปลอดเชื้อเพื่อให้เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่อยู่ในเนื้อเยื่อของรากหลุดออกมา โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ละ 1 มิลลิลิตร จนได้เป็นสารละลาย จากนั้นบีบเปิดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายโซเดียมเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเจือจาง 10 เท่า และทำการเจือจางอีกเป็น 100 และ 1,000 เท่า และทิ้งให้สารละลายแต่ละความเจือจางตกตะกอน แล้วบีบเปิดส่วนใสมาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เพื่อทำการ spread plate ลงบนอาหาร SCN (Starch casein agar) ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะนิสเตติน (Nystatin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำ control plate จากน้ำกลั่นที่ใช้ล้างรากพืชเป็นน้ำสุดท้าย ด้วยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.5 การคัดเลือก การทำให้บริสุทธิ์ และการจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

เมื่อบ่มเชื้อในอาหาร SCN ที่มีการเติมนิสเตติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันแล้ว ทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท คือ โคโลนีจะมีเส้นใยที่จมลงไปในอาหาร (Substrate Mycelium) และผิวด้านบนของโคโลนีมีลักษณะด้าน ไม่มันวาว โดยนำเข็มเย็บเชื้อปลายแหลม (MicroNeedle) แตะเชื้อมาขีดเป็นเส้นตรงบนอาหาร 1/10 ISP2 (1/10 Yeast extract Malt extract agar) ที่มีการเติมนิสเตติน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเชื้อเจริญ จะใช้ MicroNeedle แตะสปอร์ของเชื้อมา cross streak บนอาหาร ISP2 (Yeast extract Malt extract agar) เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony)

นำเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ISP2 เพื่อศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ โดยนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงครบ 14 วัน มาตรวจจุดลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า จากนั้นจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะของสปอร์

3.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

นำเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทมาชีตบนอาหาร ISP2 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน หลังจากนั้นจึงชีตเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และยีสต์ *Candida albicans* โดยชีตในแนวตั้งฉากกับเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (Inhibition zone) เทียบกับ control plate ซึ่งเป็นอาหาร ISP2 ที่ชีตเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไว้

3.7 การเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการเลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มากรองแยกส่วนตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยการกรองแบบลดความดัน โดยส่วนของน้ำหมักจะนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท และนำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส จึงได้สารสกัดหยาบในส่วนของน้ำหมัก ส่วนตัวเซลล์นำไปหมักด้วยเมทานอลและบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไปกรองแยกตัวเซลล์ออก และระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ จึงได้สารสกัดหยาบในส่วนของตัวเซลล์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.8.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 เตรียมได้โดยใช้ไม้ปั่นสำลีป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบผสมลงในหลอดน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

(0.85% NaCl) ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับแม็คฟาร์แลนด์ เบอร์ 0.5 (McFarland no. 0.5) ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1.5×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคทีโนมัยสีท

ละลายสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักและตัวเซลล์ด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารละลายที่ได้ลงบนแผ่นดิสก์ (Disc) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้แผ่นดิสก์แห้ง

3. ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc diffusion

ใช้ไม้พันสำลีทาเชื้อลงบนผิวหนังอาหาร (Swab) เป็นแนวระนาบจำนวน 3 ระนาบ จากนั้นวางแผ่นดิสก์ ซึ่งหยดสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นดิสก์ ทำชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) โดยใช้เมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดหยาบ และชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) โดยใช้แผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะสำหรับเชื้อทดสอบ นั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (Inhibition zone)

3.8.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1. เตรียมสารสกัดหยาบ

หาน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักและตัวเซลล์ ละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางลงครึ่งหนึ่ง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf) ใหม่ เติมนเมทานอลลงไปในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) ได้สารละลายเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางลงครึ่งหนึ่งเรื่อยๆ ให้ได้สารละลายความเข้มข้น 250, 125, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 และ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งผง BHT ปริมาณ 0.0012 กรัม ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เพื่อให้ได้สารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางลงครึ่งหนึ่ง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย BHT เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 600 มิลลิลิตร ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟใหม่ เติมนเมทานอล 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ได้สารละลาย BHT เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางลงครึ่งหนึ่งเรื่อยๆ ให้ได้สารละลาย BHT ความเข้มข้น 250, 125, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 และ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

ชั่งผง DPPH ปริมาณ 0.008 กรัม ลงในปิเกตอร์ ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้
เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปละลายตะกอนด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียง

(Sonicator) เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ถ้วยสารละลายลงขวด Duran แล้วนำไปละลายตะกอนอีกครั้งด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำขวด Duran มาห่อด้วยฟอยล์ แล้วนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

หยอดสารละลายจากสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ในอัตราส่วน 1:1 บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เพื่อนำมาคำนวณ %Inhibition และสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้น เพื่อกำหนดหา IC₅₀

5. คำนวณ %Inhibition

$$\%Inhibition = \frac{[(A_{DPPH} - A_{Blank DPPH}) - (B_{sample} - B_{Blank sample})]}{(A_{DPPH} - A_{Blank DPPH})} \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

3.9 การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสิทเบื้องต้น

3.9.1 สกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสิทในอาหารแข็ง ISP2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อโดยใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ (Loop) ขูดโคลนขึ้นมาสใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟ เติม TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในเครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จนท่วมตัวอย่างในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้ในหลอดจะแยกชั้นกัน เก็บส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟใหม่ จากนั้นเติมเอทานอลที่เย็นจัดให้มีปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ทำการเขย่าหลอดเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 - 20 นาที เทส่วนใสทิ้งจนเหลือแค่ตะกอนที่ติดหลอด คว่ำหลอดบนที่ขลุ่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอจนตะกอนแห้ง จึงเติม SSC

เอกสาร ความเข้มข้น 0:1 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอ และคำนวณความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.2 เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ใส่ลงหลอดเอพเพนดอร์ฟ เติมสารชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้นและปริมาณดังตาราง 3.1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (thermal cycler) โดยใช้วงจรพีซีอาร์ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer : 9F	10.0 μ M	5.0 μ l
Primer : 1541R	10.0 μ M	5.0 μ l
dNTP	2.0 mM	8.0 μ l
10X Taq buffer	10X	0.5 μ l
MgCl ₂	25.0 mM	8.0 μ l
Taq DNA Polymerase	5 Unit/ μ l	0.5 μ l
Milli Q water	-	61.5 μ l
Template DNA	100 - 200 ng/ μ l	2.0 μ l
รวม		100 μ l

ที่มา : ดัดแปลงจาก นันทวัน, 2555

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycle)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	Denaturation step
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซลเซียส	1 นาที		25
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	1	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที		
รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที			

ที่มา : นันทวัน, 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA แล้วจะนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดเอพเพนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ในคอลัมน์ FADF column และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวที่ตกจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอด ทดลองขนาดเล็กอันใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตรใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.9.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสายวิวัฒนาการ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการจัดเรียง (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล EzBioCloud โดยใช้โปรแกรม Bioedit และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA V.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

เมื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากรากพลูด่างและรากกล้วย ที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวด้านนอกของราก ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้จำนวน 30 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากรากพลูด่าง 27 ไอโซเลต และเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากรากกล้วย 3 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ชนิดรากพืช สถานที่เก็บ และไอโซเลตของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้

ชนิดรากพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต				
รากพลูด่าง	เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5
		PC1-6	PC1-7	PRB2-1	PRB2-2	PRB2-3
		PP3-1	PP3-2	PP3-3	PO4-1	PO5-1
		PBL6-1	PBL6-2	PBL6-3	PBL6-4	PBL6-5
		PBL6-6	PBL6-7	PBL6-8	PO7-1	PP8-1
		PP9-1	POR10-1			
รากกล้วย	เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย	BW5-2	BW13-1	BW13-2		

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากกล้วยมีจำนวนน้อย เพียง 3 ไอโซเลต เมื่อเทียบกับพลูด่าง อาจมีสาเหตุจากการที่ผู้ทดลองตัดชิ้นตัวอย่างขนาดเล็กจนเมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อ ทำให้เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในรากถูกทำลายโดยสารเคมีที่ใช้ในการฟอก และสภาวะในการฟอกฆ่าเชื้ออาจยังไม่เหมาะสม ทำให้มีจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการเจริญขึ้นจำนวนมากจนอาจคลุมโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่มีขนาดเล็กได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือก และจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

นำเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท 30 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract – malt extract agar (ISP2) เพื่อตรวจสอบการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยสังเกตจากโคโลนีหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 14 วัน เพื่อตรวจสอบการเจริญ สีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร ลักษณะสปอร์ และสีของรงควัตถุของเชื้อ พบว่า

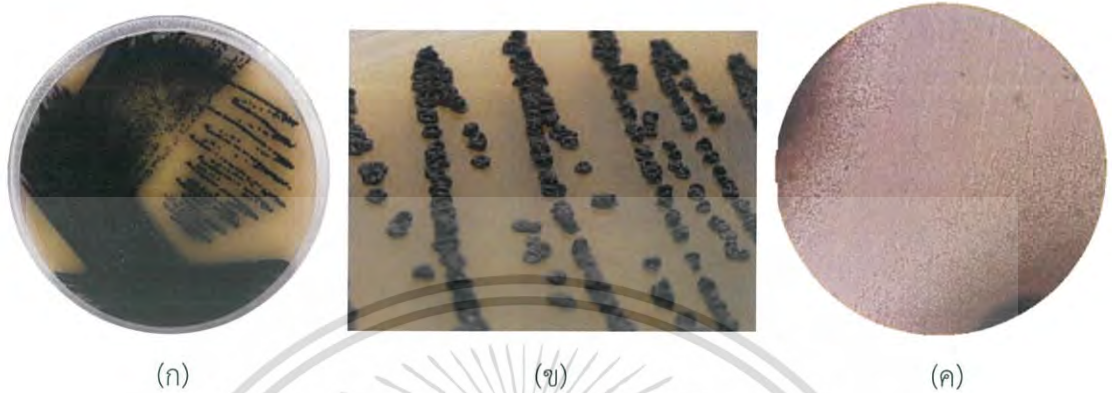
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-1 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 เมื่อถึงระยะสร้างสปอร์โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้มอมเทา (Dark Grayish Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.1 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

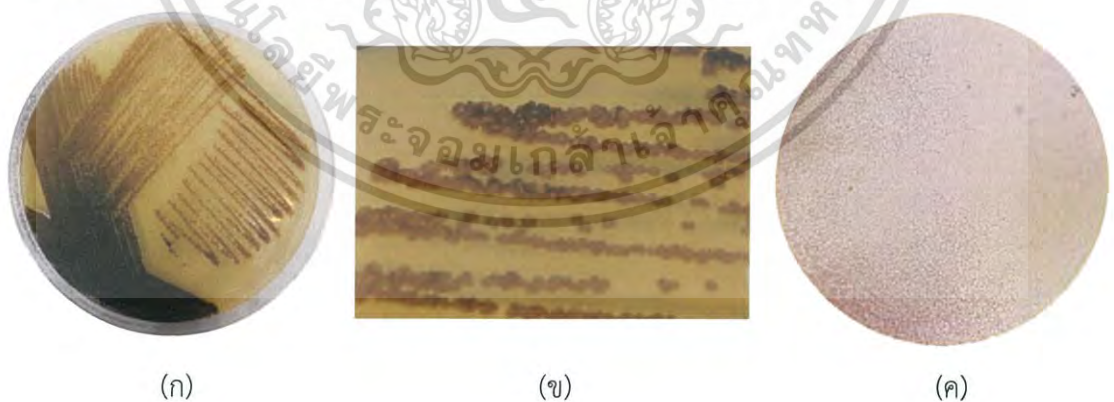
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลินีมีลักษณะนูน มีรอยพับอยู่บนโคโลนี ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.2 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค)แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

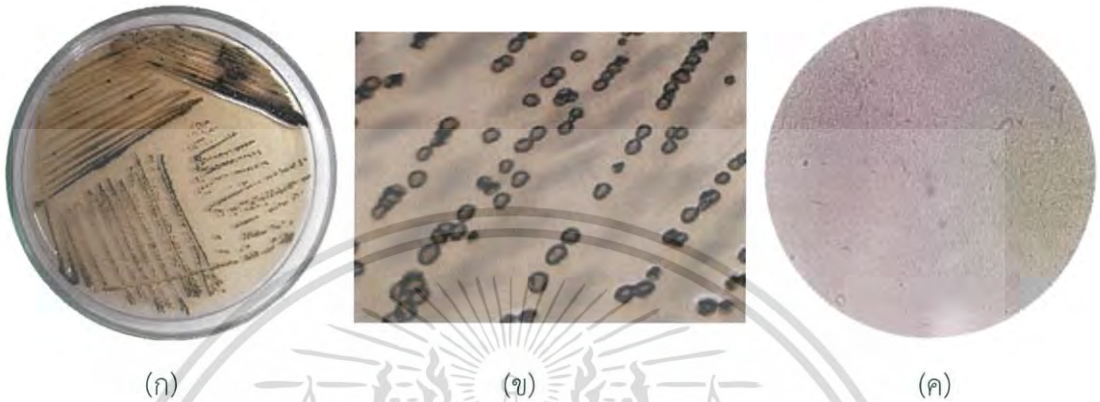
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-3 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนีแข็ง เมื่อถึงระยะสร้างสปอร์โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีมะกอกเข้ม (Dark olive) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.3 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-3 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค)แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

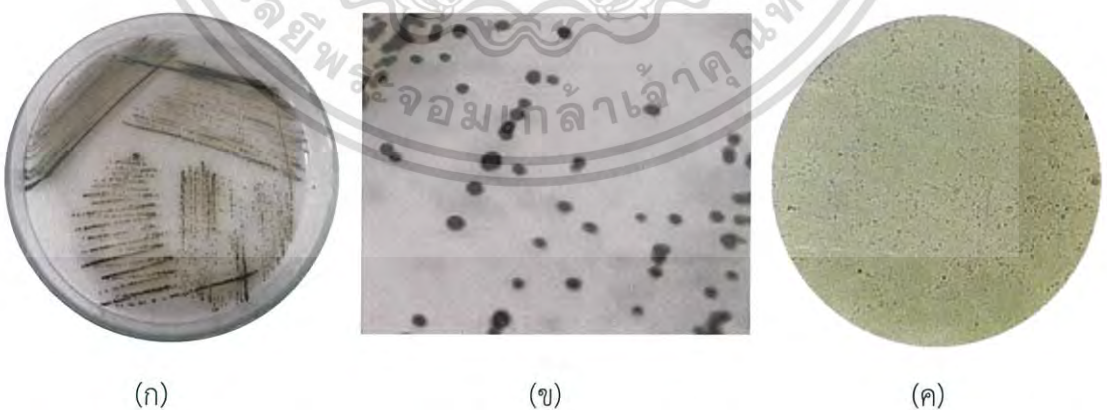
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-4 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนี
 หนูน มีรอยพับอยู่บนโคโลนี เมื่อถึงระยะสร้างสปอร์โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว
 ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) ไม่มีการสร้าง
 รงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล
Micromonospora



รูปที่ 4.4 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-4 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
 (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง
 ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

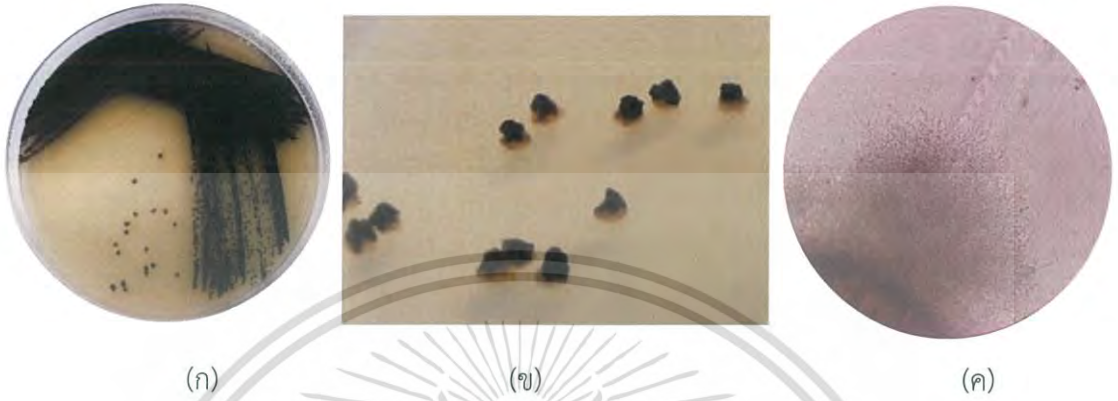
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-5 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำ
 ชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark
 Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึง
 กับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.5 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-5 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
 (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-6 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมกะกอก (Dark Olive Brown) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.6 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-6 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

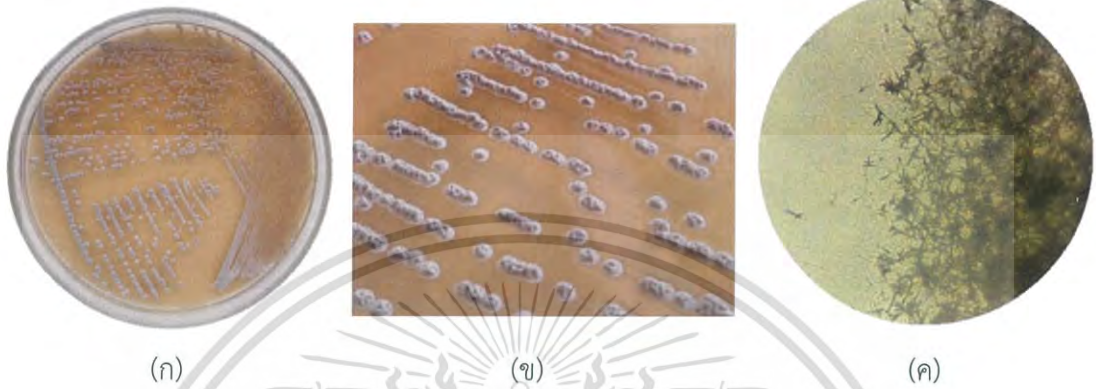
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PC1-7 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 ลักษณะโคโลนี นูน มีรอยพับที่ขอบโคโลนี ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมกะกอกอ่อน (Light Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.7 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PC1-7 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

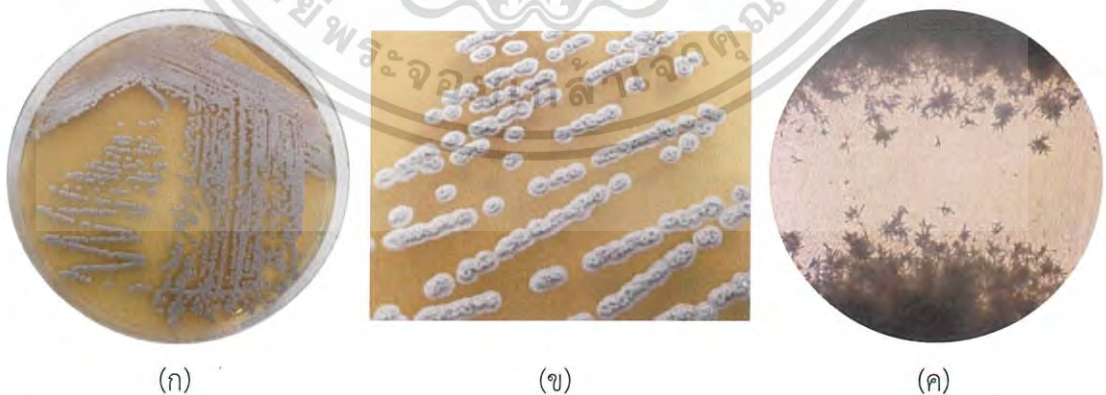
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PRB2-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีลักษณะแข็ง มีรอยพับบนโคโลนี สร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Very Light Purplish Blue) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมส้ม (Brownish orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายตรง สั้น รวมกันเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.8 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PRB2-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

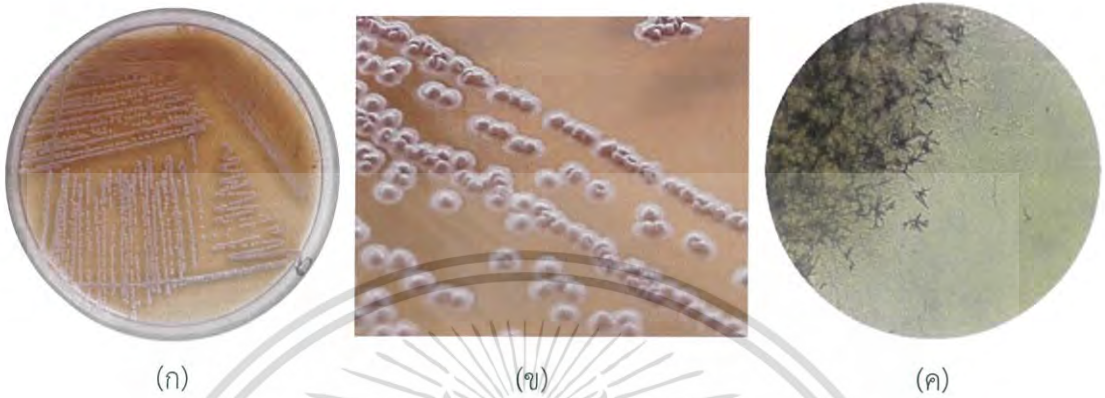
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PRB2-2 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคโลนีลักษณะแข็ง มีรอยพับบนโคโลนี สร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Very Light Purplish Blue) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมส้ม (Brownish orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายตรง สั้น รวมกันเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.9 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PRB2-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

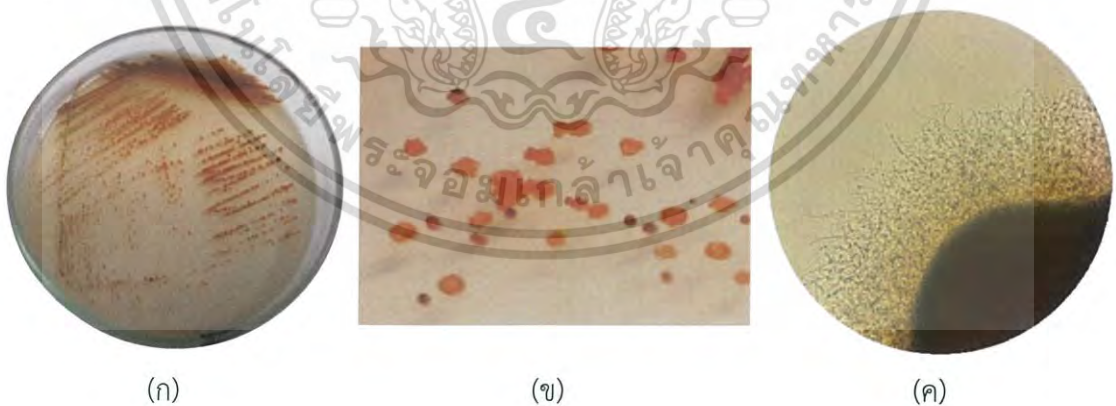
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เอกสารระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PRB2-3 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนีสีลักษณะแข็ง มีรอยพับบนโคลนีสี สร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Very Light Purplish Blue) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมส้ม (Brownish orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นสายตรง สั้น รวมกันเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.10 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PRB2-3 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

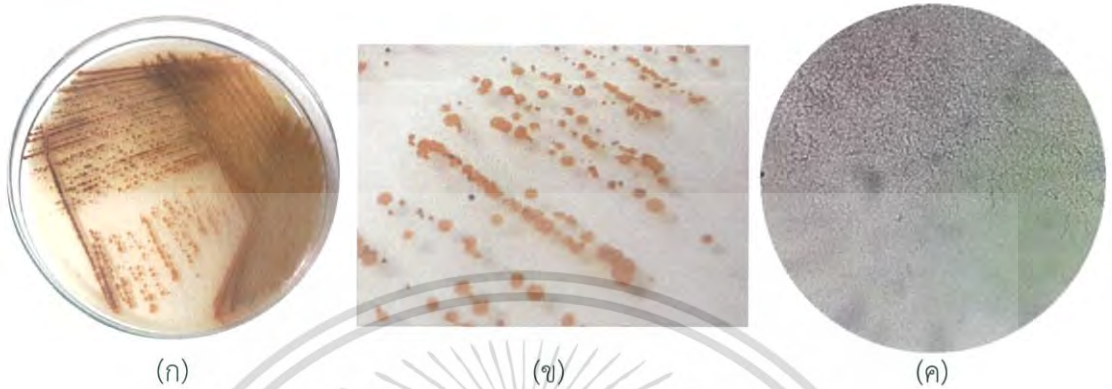
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP3-1 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคลนีสีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคลนีสี ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.11 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP3-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

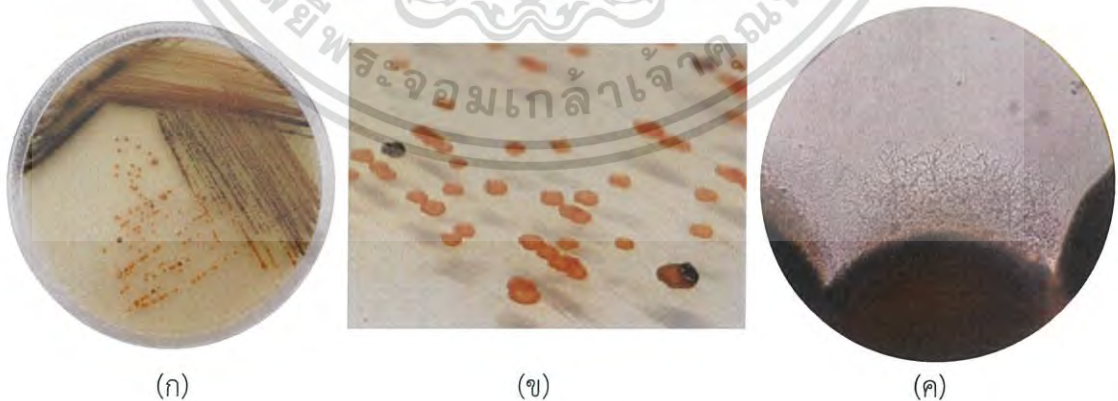
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP3-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคโลนี ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.12 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP3-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP3-3 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคโลนี ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.13 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP3-3 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PO4-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนนี้มีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.14 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PO4-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PO5-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนนี้มีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีท สกุล *Micromonospora*

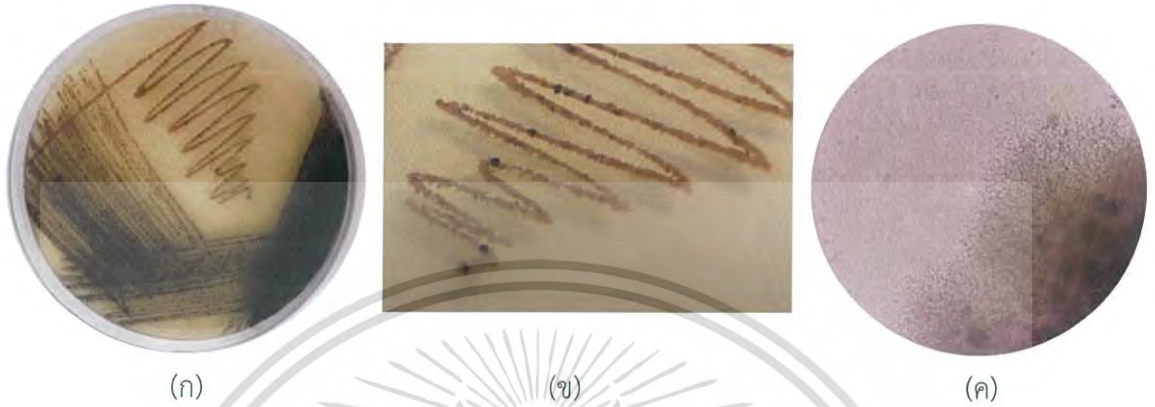


รูปที่ 4.15 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PO5-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

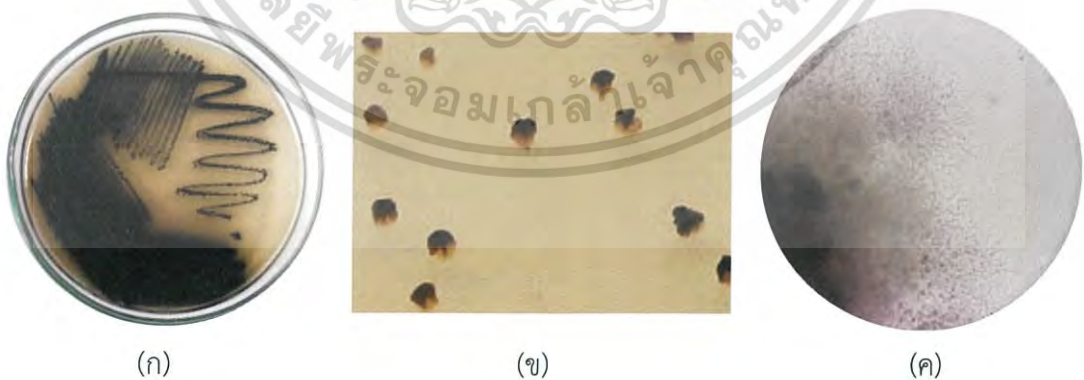
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนีนีมีลักษณะแข็ง ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.16 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนีนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะชั้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*

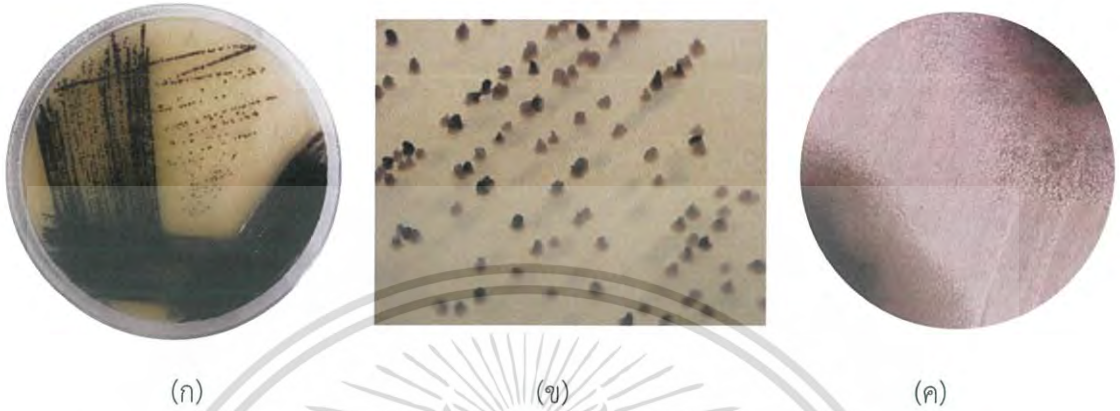


รูปที่ 4.17 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

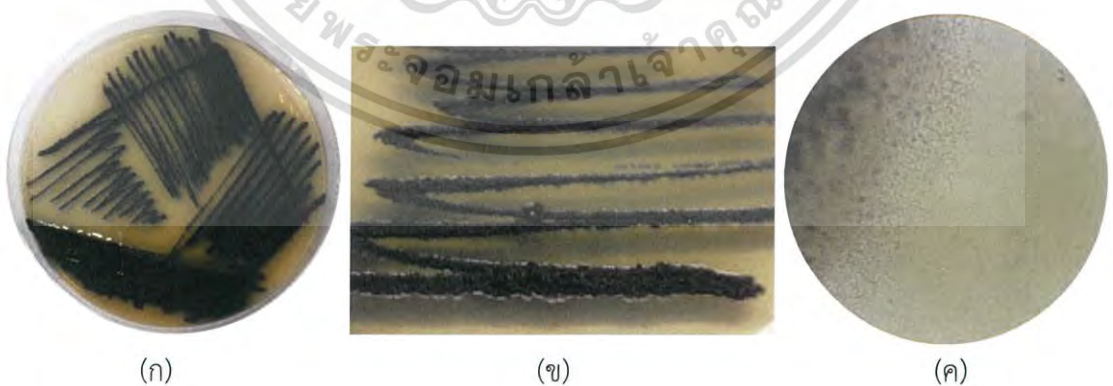
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-3 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนีสมีลักษณะแข็ง ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาลมะกอก (Dark Olive Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



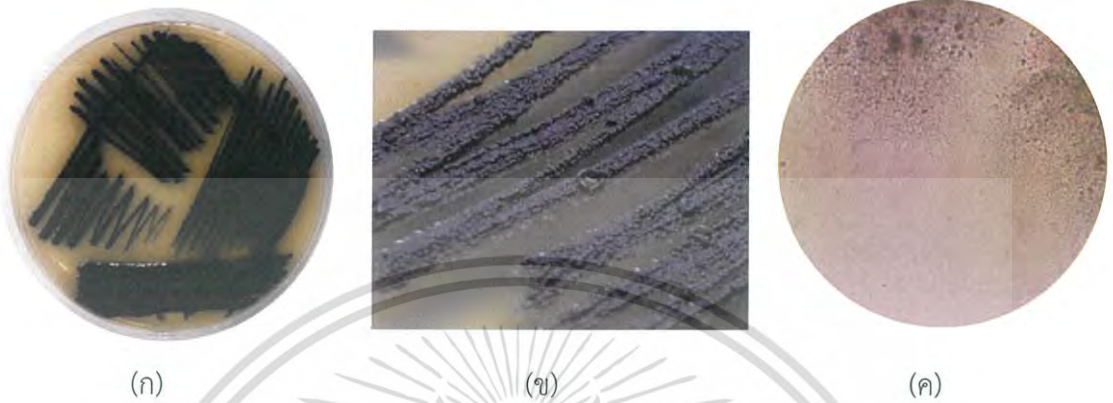
รูปที่ 4.18 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-3 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-4 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคลนีสมีลักษณะแข็ง ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



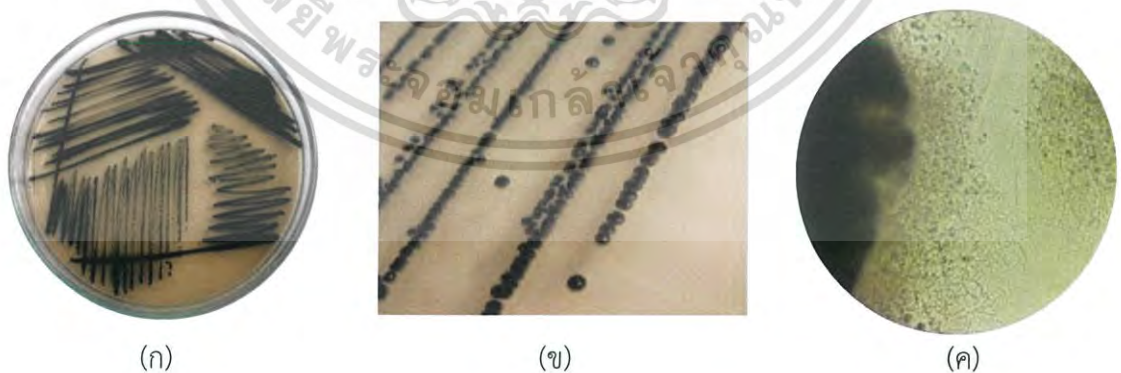
รูปที่ 4.19 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-4 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เอกสาร ระวังภัย (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-5 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.20 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-5 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PBL6-6 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) สร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*

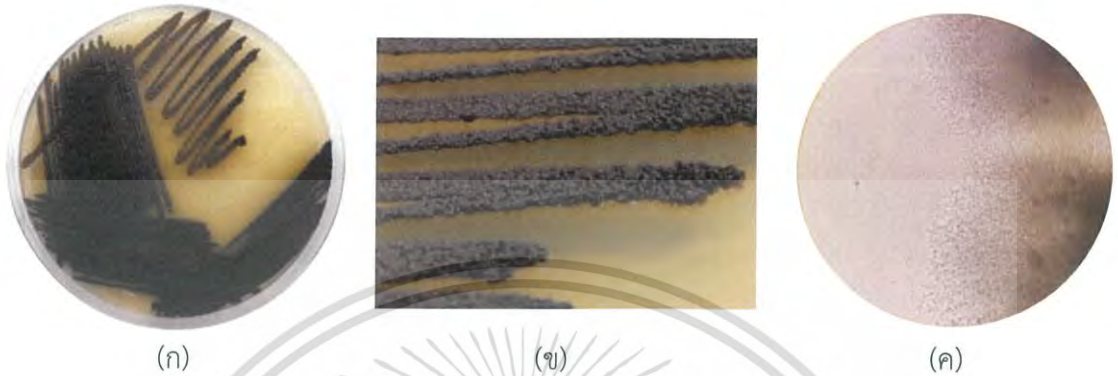


รูปที่ 4.21 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-6 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

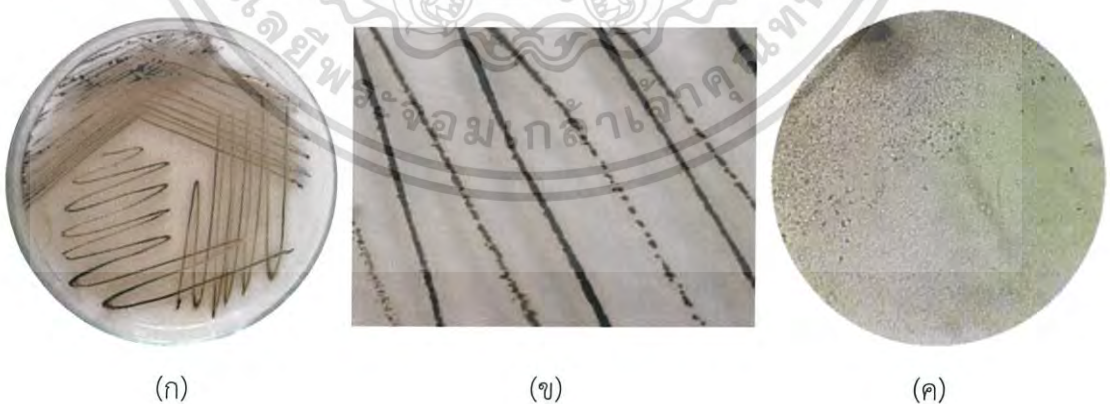
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PBL6-7 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะแข็ง ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.22 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-7 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PBL6-8 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำขุ่นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*

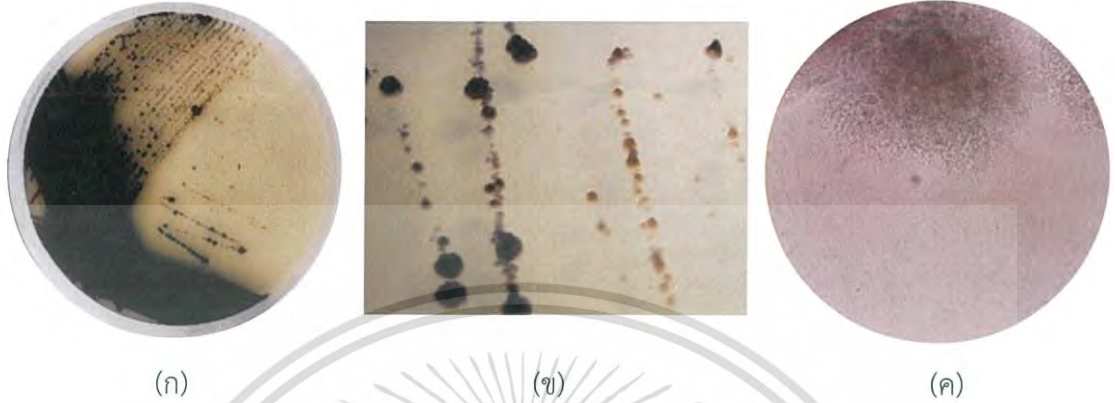


รูปที่ 4.23 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PBL6-8 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง

ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

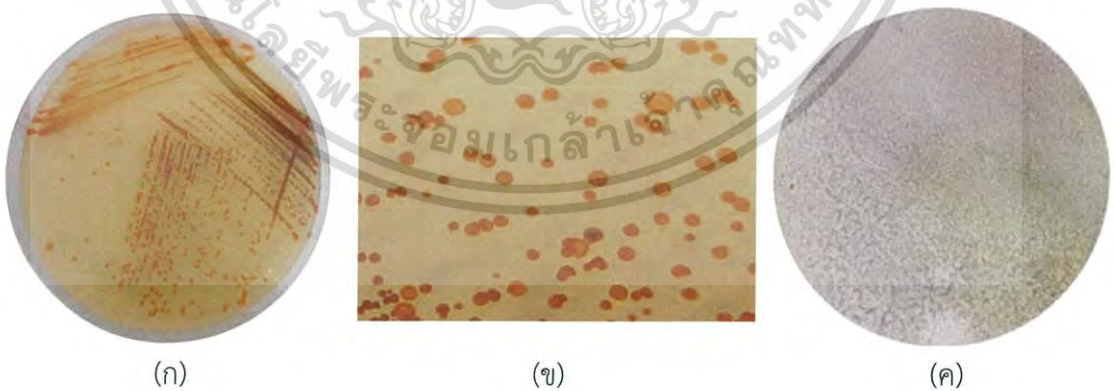
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PO7-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีเมือกสีดำชั้นคลุม ลักษณะขึ้น เป็นมันวาว ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีดำ (Black) มีการสร้างรงควัตถุสีดำ สร้างสปอร์เป็นก้อนกลมคล้ายถึงหุ้มสปอร์ มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.24 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PO7-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

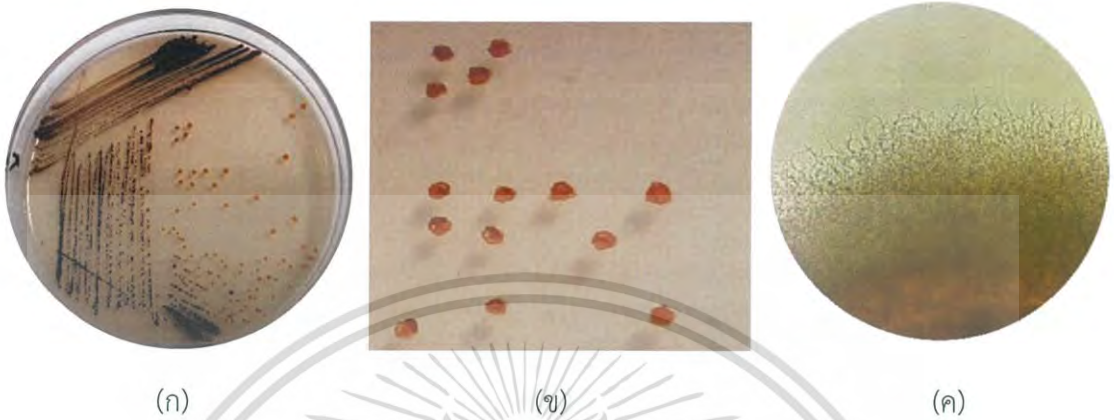
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP8-1 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคโลนี ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีส้มอมเหลือง (Strong Orange Yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์แบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.25 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP8-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

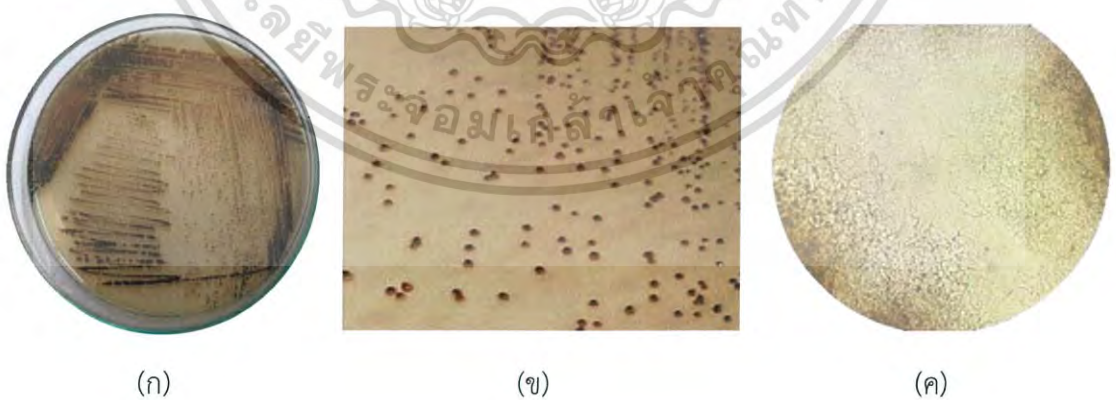
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP9-1 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคโลนี ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีส้ม (Vivid Orange) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.26 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP9-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต POR10-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะนูน มีรอยพับบนโคโลนี ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีน้ำตาล (Strong Brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบเดี่ยวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีท สกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.27 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต POR10-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BW5-2 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะ นิ่ม ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหารสีขาวนวล (White) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์อัดแน่นเป็นก้อนกลม มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora*



รูปที่ 4.28 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BW5-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

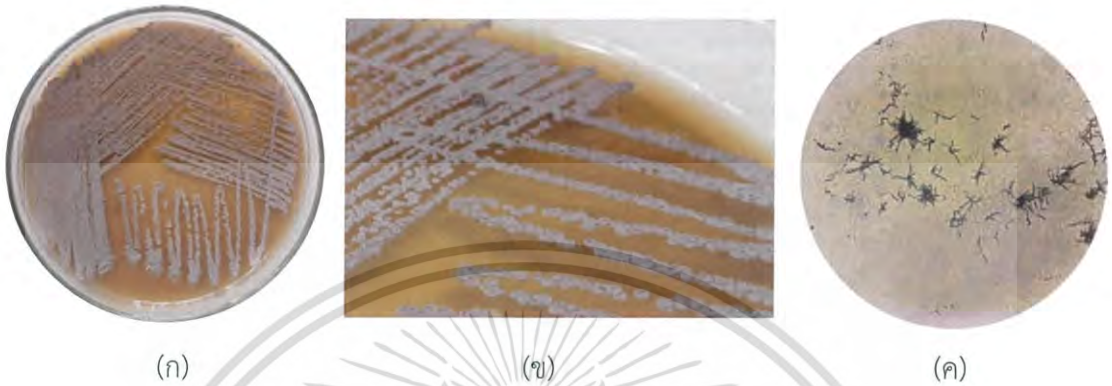
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลต BW13-1 เจริญได้ดีมากในอาหาร มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Pale Blue) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้มอมเหลือง (Deep yellowish brown) มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล สร้างสปอร์เป็นสายตรง สั้น รวมกันเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.29 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BW13-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
(ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต BW13-2 เจริญได้ดีมากในอาหาร ISP2 โคโลนีมีลักษณะคล้ายฝุ่นแป้ง มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา (Pale Blue) และเส้นใยอาหารสีน้ำตาลเข้มอมเหลือง (Deep yellowish brown) มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล สร้างสปอร์เป็นสายตรง สั้น รวมกันเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*



รูปที่ 4.30 (ก) และ (ข) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BW13-2 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) แสดงลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 14 วัน

เชื้อ	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PC1-1	ดี	-	สีน้ำตาลเข้มอมเทา	-
PC1-2	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PC1-3	ดีมาก	-	สีมะกอกเข้ม	-
PC1-4	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	-
PC1-5	ดี	-	สีน้ำตาลมะกอก	-
PC1-6	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	สีดำ
PC1-7	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอกอ่อน	-
PRB2-1	ดีมาก	สีเทา	สีน้ำตาลอมส้ม	-
PRB2-2	ดี	สีเทา	สีน้ำตาลอมส้ม	-
PRB2-3	ดีมาก	สีเทา	สีน้ำตาลอมส้ม	-
PP3-1	ดี	-	สีส้ม	-
PP3-2	ดีมาก	-	สีส้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและสีฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทบนอาหาร yeast extract – malt extract agar ระยะเวลา 14 วัน (ต่อ)

เชื้อ	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
PP3-3	ดีมาก	-	สีส้ม	-
PO4-1	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	-
PO5-1	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	สีดำ
PBL6-1	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	-
PBL6-2	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	สีดำ
PBL6-3	ดีมาก	-	สีน้ำตาลมะกอก	-
PBL6-4	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PBL6-5	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PBL6-6	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PBL6-7	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PBL6-8	ดีมาก	-	สีดำ	-
PO7-1	ดีมาก	-	สีดำ	สีดำ
PP8-1	ดี	-	สีส้มอมเหลือง	-
PP9-1	ดี	-	สีส้ม	-
POR10-1	ดีมาก	-	สีน้ำตาล	-
BW5-2	ดี	-	สีขาวนวล	-
BW13-1	ดีมาก	สีเทา	สีน้ำตาลเข้มอมเหลือง	สีน้ำตาล
BW13-2	ดีมาก	สีเทา	สีน้ำตาลเข้มอมเหลือง	สีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

ในจำนวนเชื้อเอนโดไฟติกแอสคิตโนมัยสที่คัดแยกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต ไม่พบว่ามีไอโซเลตใดที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้เลย

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

ไอโซเลต	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
	1	2	3	4	5	6	7
PC1-1	-	-	-	-	-	-	-
PC1-2	-	-	-	-	-	-	-
PC1-3	-	-	-	-	-	-	-
PC1-4	-	-	-	-	-	-	-
PC1-5	-	-	-	-	-	-	-
PC1-6	-	-	-	-	-	-	-
PC1-7	-	-	-	-	-	-	-
PRB2-1	-	-	-	-	-	-	-
PRB2-2	-	-	-	-	-	-	-
PRB2-3	-	-	-	-	-	-	-
PP3-1	-	-	-	-	-	-	-
PP3-2	-	-	-	-	-	-	-
PP3-3	-	-	-	-	-	-	-
PO4-1	-	-	-	-	-	-	-
PO5-1	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-1	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-2	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-3	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-4	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-5	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-6	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-7	-	-	-	-	-	-	-
PBL6-8	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น (ต่อ)

ไอโซเลต	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
	1	2	3	4	5	6	7
PO7-1	-	-	-	-	-	-	-
PP8-1	-	-	-	-	-	-	-
PP9-1	-	-	-	-	-	-	-
POR10-1	-	-	-	-	-	-	-
BW5-2	-	-	-	-	-	-	-
BW13-1	-	-	-	-	-	-	-
BW13-2	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- (1) *Escherichia coli* ATCC 25922
- (2) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785
- (3) *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- (4) *Micrococcus luteus* ATCC 934
- (5) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- (6) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 2065
- (7) *Candida albicans* ATCC 1023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion

หลังจากทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี primary screening แล้ว พบว่าไม่มีไอโซเลตใดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงไม่มีการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion ต่อ

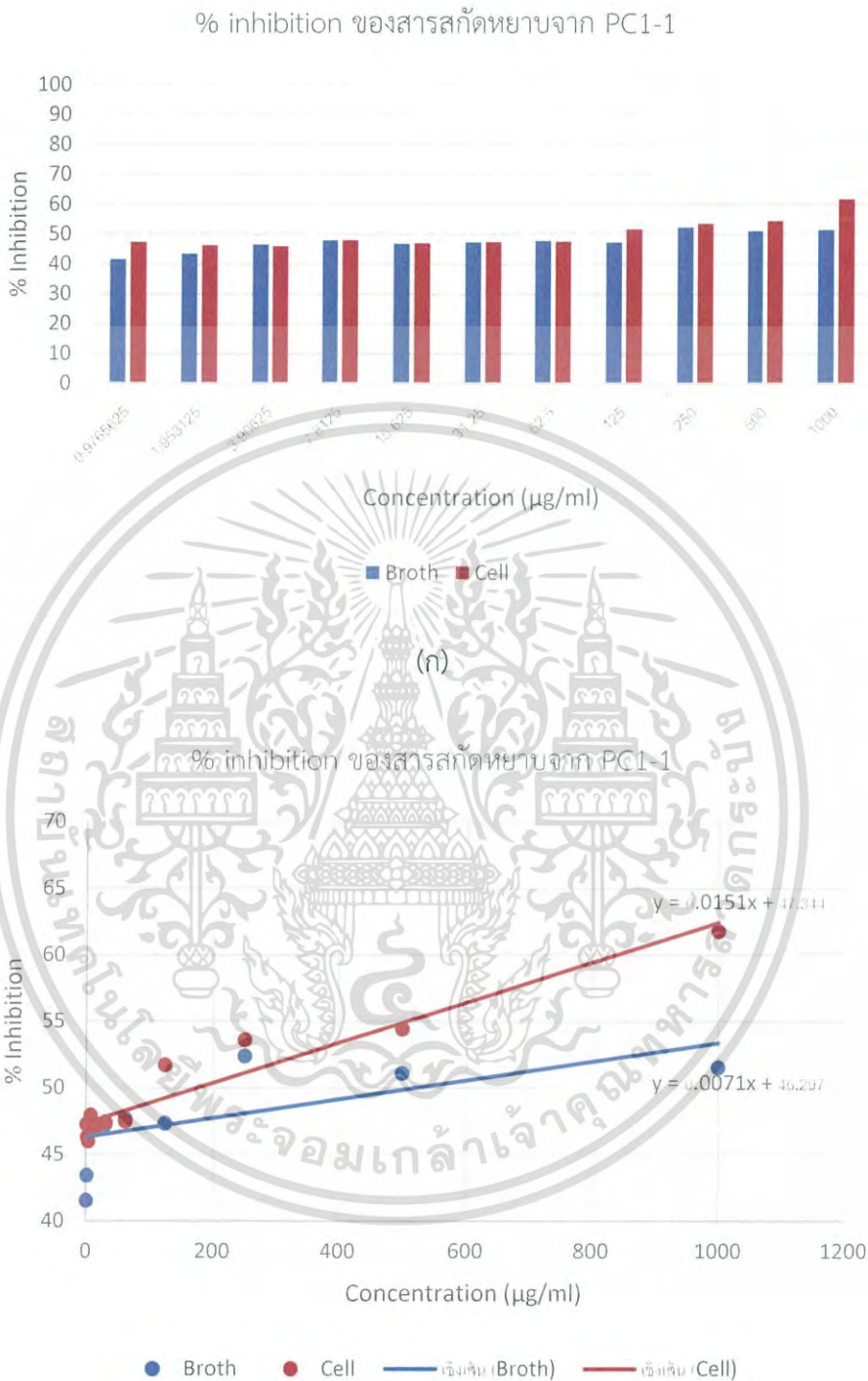
4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เมื่อทำการละลายสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักและตัวเซลล์ด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 0.97, 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ที่ละลายด้วยเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณหา % inhibition และคำนวณหาค่า IC_{50} ได้จากกราฟเส้นตรงที่พล็อตระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในแต่ละส่วน ได้ผลดังที่แสดงในตารางและรูปต่อไปนี้

ตารางที่ 4.4 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PC1-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PC1-1	0.9765	41.5369	47.2626	56.1357
	1.9531	43.4203	46.2832	57.7001
	3.9062	46.4339	45.9819	61.6619
	7.8125	47.8653	47.9407	68.3462
	15.6250	46.8106	47.0366	72.7752
	31.25	47.2626	47.4133	84.1121
	62.50	47.7147	47.4886	91.2230
	125	47.3380	51.7076	95.3271
	250	52.3857	53.5911	96.6883
	500	51.1049	54.4198	96.4039
	1000	51.5569	61.8031	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



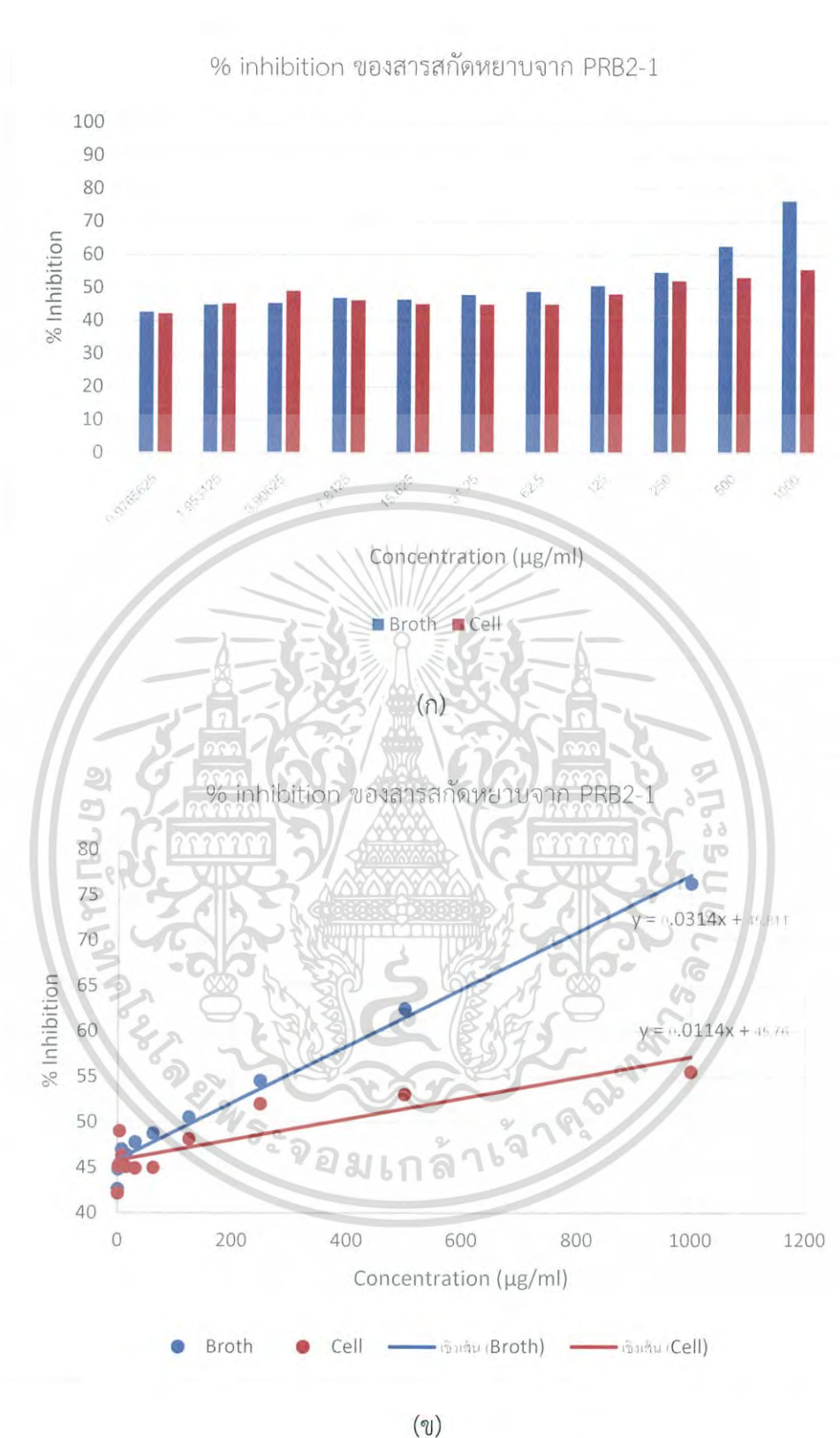
(ข)

รูปที่ 4.31 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50} เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PRB2-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PRB2-1	0.9765	42.6304	42.1463	56.1357
	1.9531	44.8090	45.1317	57.7001
	3.9062	45.3738	49.0048	61.6619
	7.8125	46.9876	46.26142	68.3462
	15.6250	46.4227	45.0510	72.7752
	31.25	47.7945	44.8897	84.1121
	62.50	48.7627	44.9704	91.2230
	125	50.5379	48.1172	95.3271
	250	54.5723	51.9903	96.6883
	500	62.4798	53.0392	96.4039
1000	76.2775	55.5406	95.9569	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก

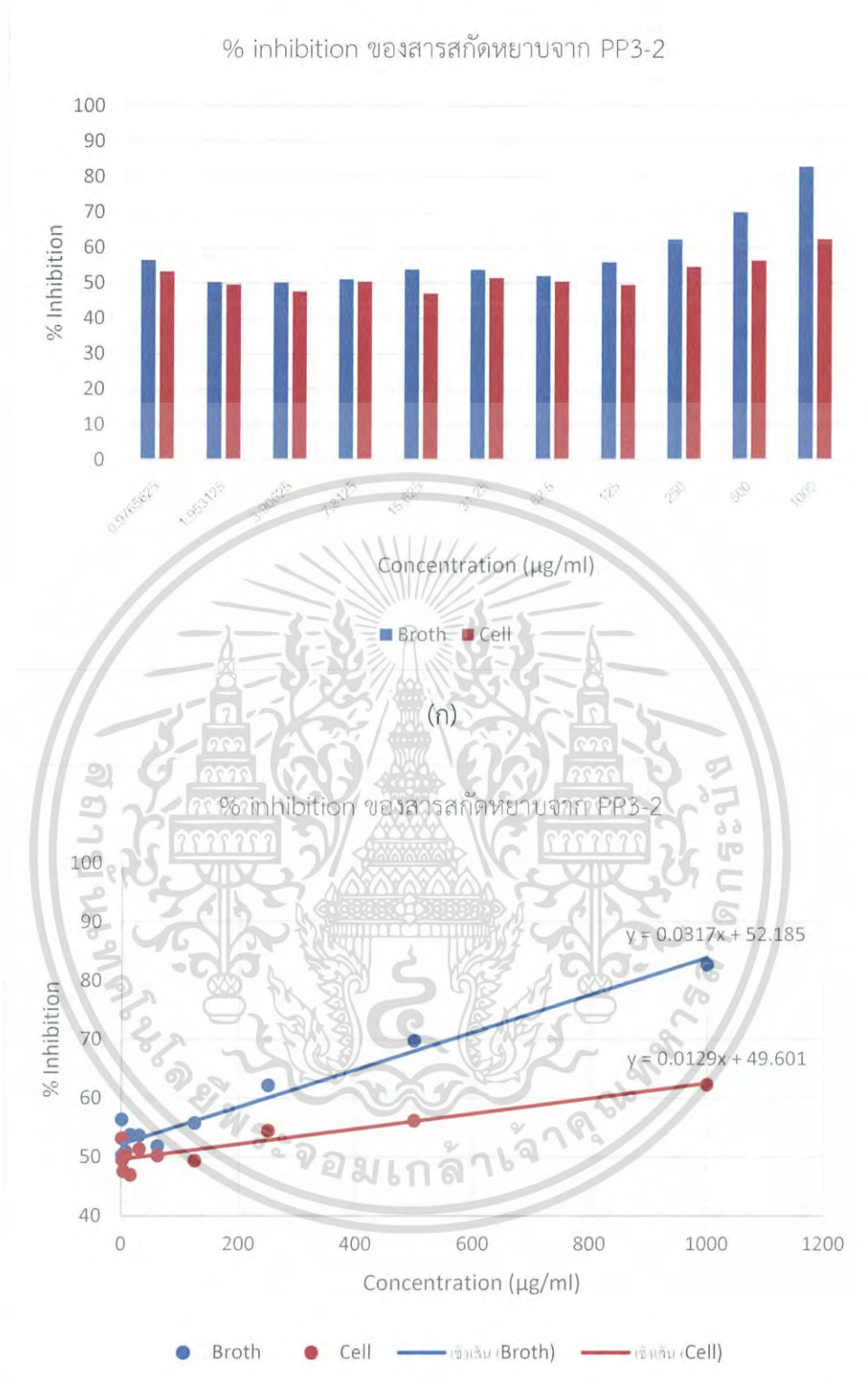
และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PP3-2

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PP3-2	0.9765	56.3941	53.1599	56.1357
	1.9531	50.2602	49.4795	57.7001
	3.9062	50.0744	47.5465	61.6619
	7.8125	50.9665	50.3346	68.3462
	15.6250	53.7546	46.9517	72.7752
	31.25	53.6803	51.3383	84.1121
	62.50	51.8463	50.285	91.2230
	125	55.7993	49.4052	95.3271
	250	62.1933	54.4734	96.6883
	500	69.8141	56.1834	96.4039
	1000	82.7138	62.3048	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

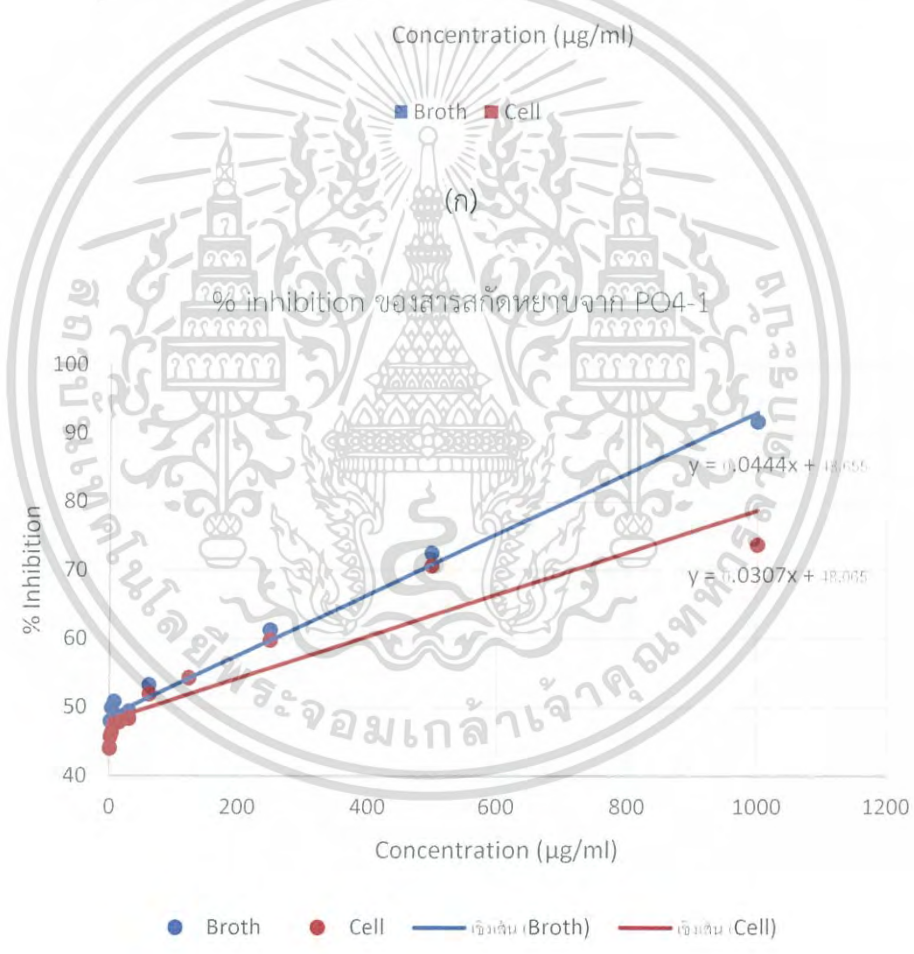
รูปที่ 4.33 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PO4-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PO4-1	0.9765	44.1895	43.9626	56.1357
	1.9531	47.9707	45.7020	57.7001
	3.9062	49.9369	46.3070	61.6619
	7.8125	50.8268	47.5170	68.3462
	15.6250	48.5757	47.8195	72.7752
	31.25	49.4076	48.3488	84.1121
	62.50	53.2644	51.9031	91.2230
	125	54.2475	54.3231	95.3271
	250	61.2805	59.7680	96.6883
	500	72.5485	70.6579	96.4039
	1000	91.7569	73.7585	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

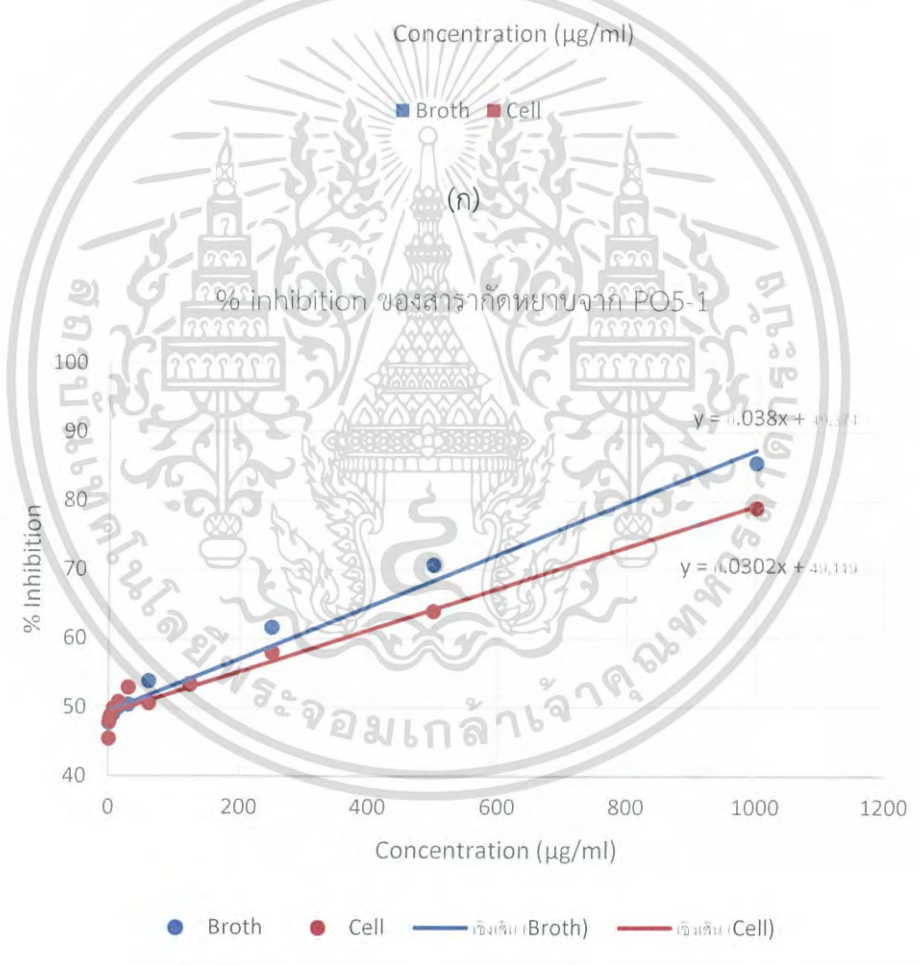
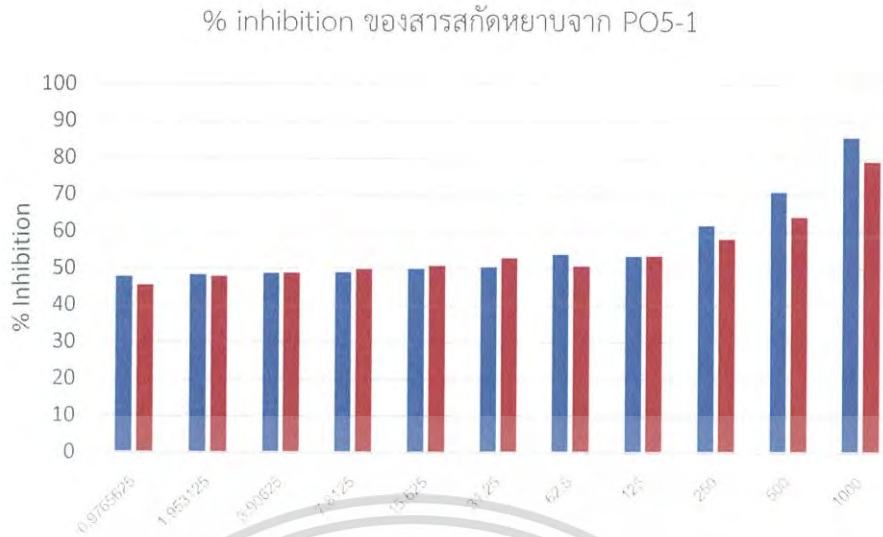
รูปที่ 4.34 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC₅₀

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PO5-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PO5-1	0.9765	47.7409	45.4819	56.1357
	1.9531	48.3433	47.9668	57.7001
	3.9062	48.7198	48.8283	61.6619
	7.8125	49.0000	49.8403	68.3462
	15.6250	49.9367	50.7981	72.7752
	31.25	50.3885	52.8614	84.1121
	62.50	53.8192	50.6024	91.2230
	125	53.3253	53.3885	95.3271
	250	61.5963	57.9819	96.6883
	500	70.7078	63.9307	96.4039
	1000	85.5421	78.9909	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

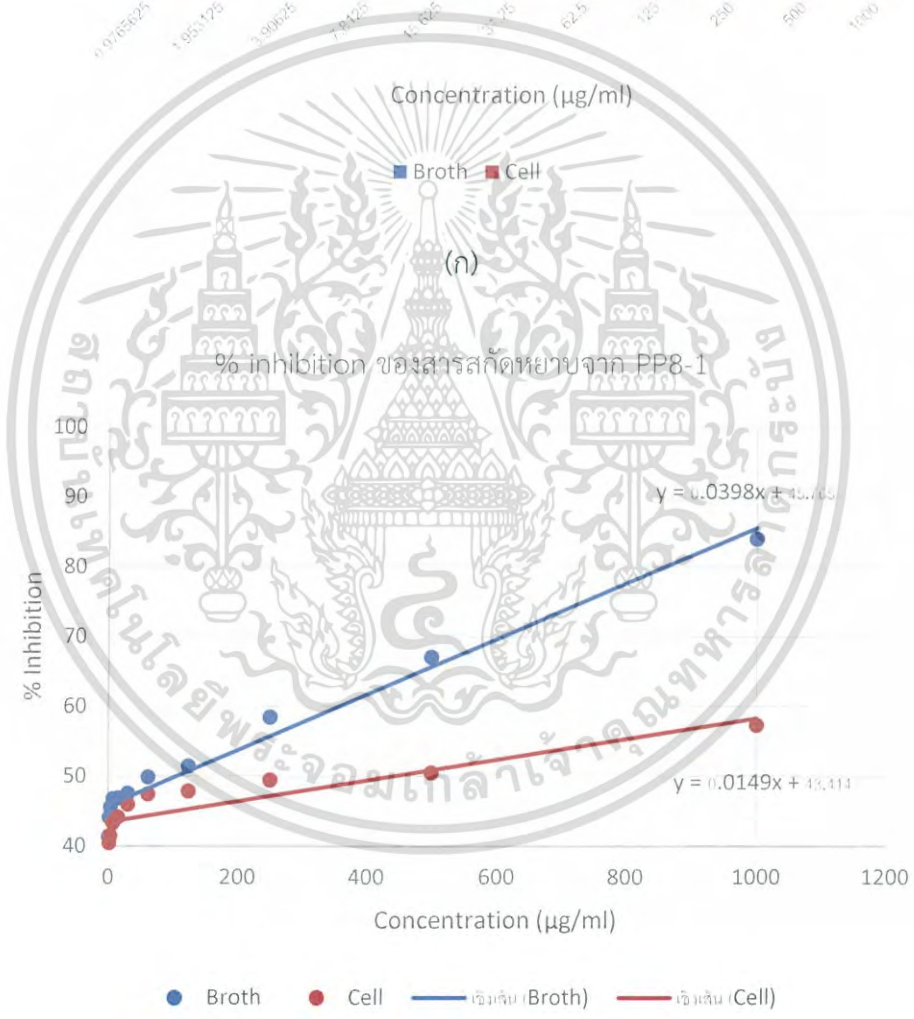
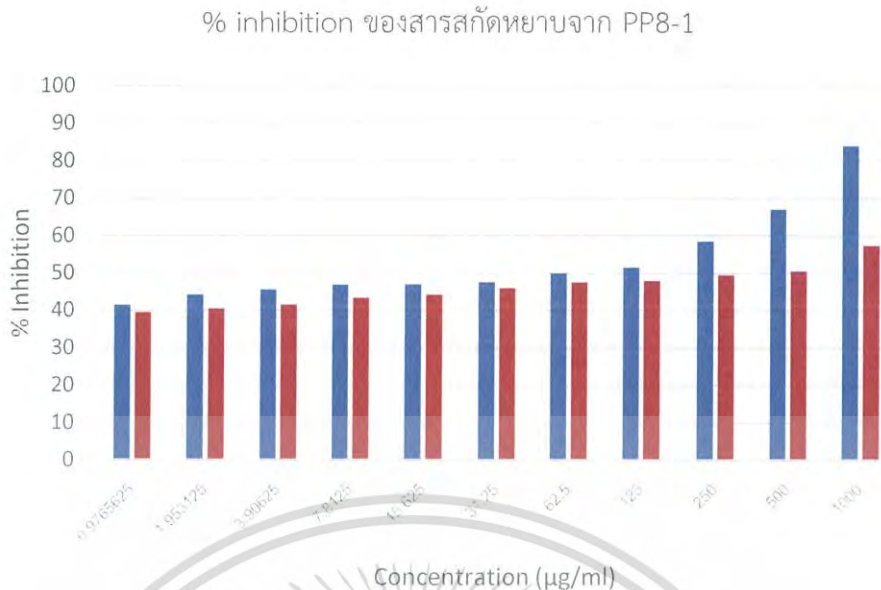
รูปที่ 4.35 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC₅₀

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต PP8-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
PP8-1	0.9765	41.3852	39.3939	56.1357
	1.9531	44.1558	40.4329	57.7001
	3.9062	45.5411	41.4718	61.6619
	7.8125	46.7532	43.2900	68.3462
	15.6250	46.8398	44.1558	72.7752
	31.25	47.5324	45.9740	84.1121
	62.50	49.8701	47.4458	91.2230
	125	51.4285	47.8787	95.3271
	250	58.4415	49.4372	96.6883
	500	67.0129	50.4761	96.4039
	1000	83.9826	57.3160	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



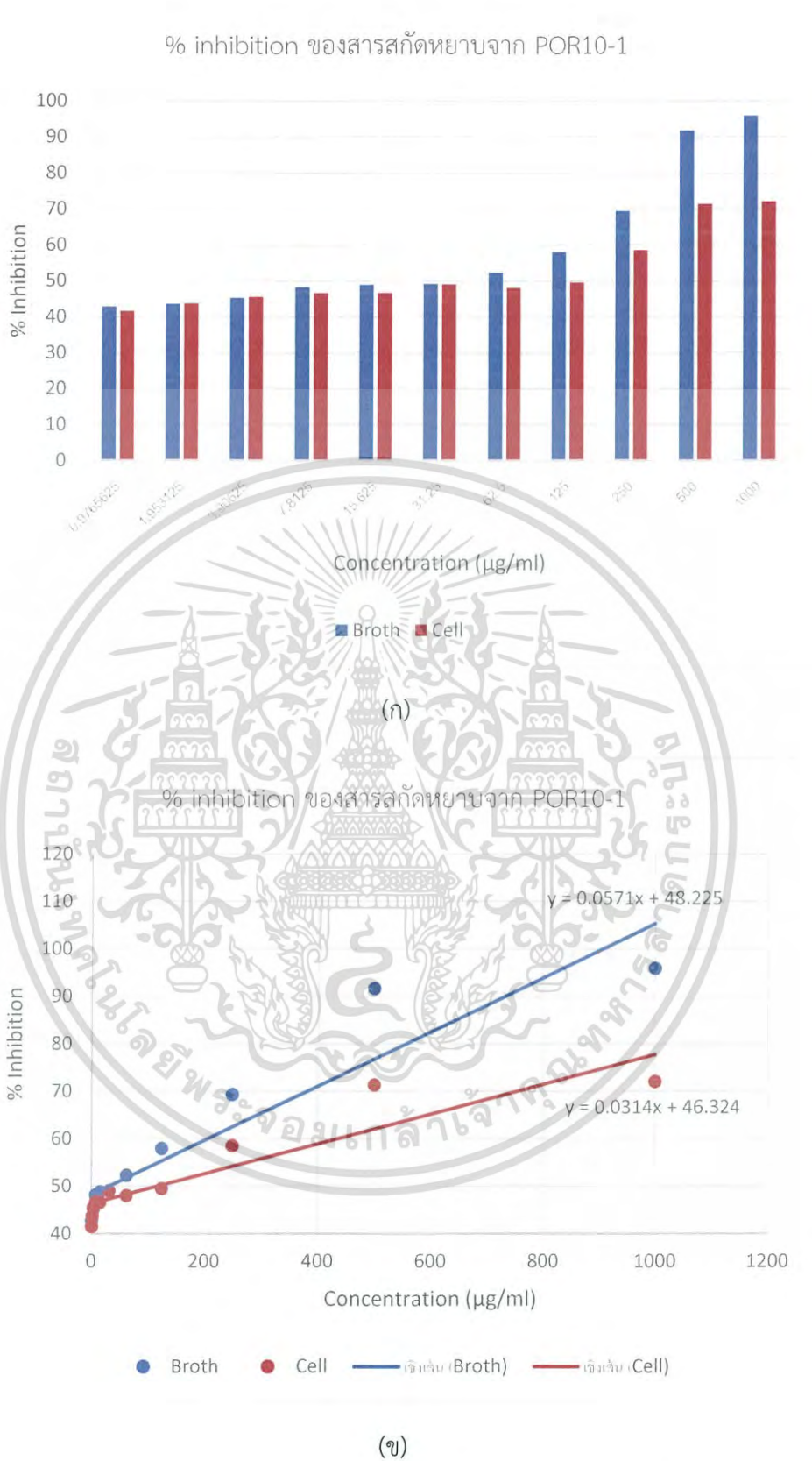
รูปที่ 4.36 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC₅₀

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต POR10-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
POR10-1	0.9765	42.8042	41.5218	56.1357
	1.9531	43.4881	43.6591	57.7001
	3.9062	45.1980	45.5400	61.6619
	7.8125	48.1903	46.6514	68.3462
	15.6250	48.7888	46.5659	72.7752
	31.25	49.0453	48.9598	84.1121
	62.50	52.2941	48.0193	91.2230
	125	57.9367	49.4728	95.3271
	250	69.3075	58.5352	96.6883
	500	91.7070	71.3593	96.4039
	1000	95.8962	72.0433	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

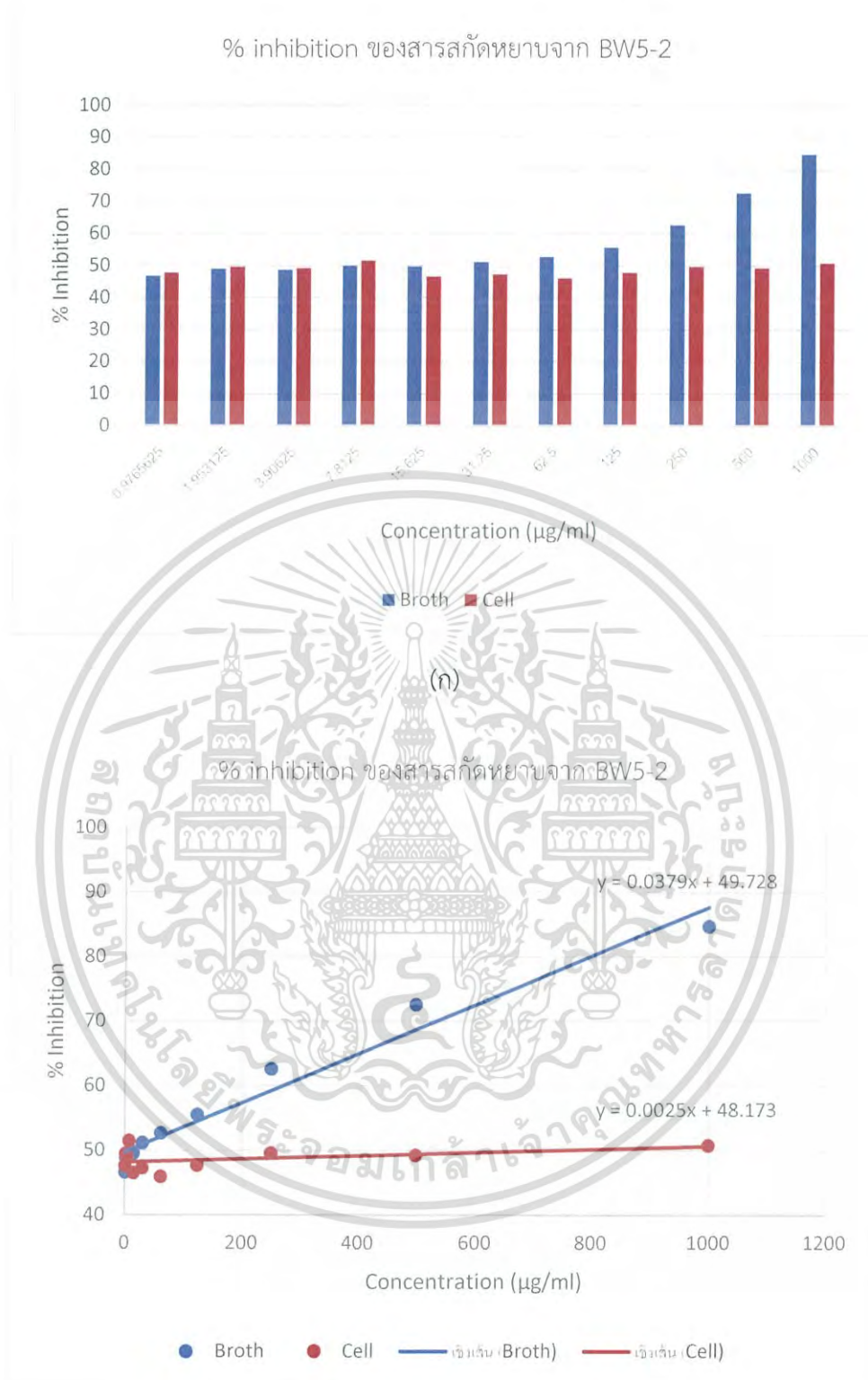


รูปที่ 4.37 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก POR10-1 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจาก POR10-1

ตารางที่ 4.11 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต BW5-2

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition (น้ำหมัก)	% inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
BW5-2	0.9765	46.6238	47.6176	56.1357
	1.9531	48.8454	49.4884	57.7001
	3.9062	48.5823	49.1669	61.6619
	7.8125	49.8684	51.4762	68.3462
	15.6250	49.5761	46.5361	72.7752
	31.25	51.1546	47.2669	84.1121
	62.50	52.7039	45.9515	91.2230
	125	55.5685	47.7053	95.3271
	250	62.6133	49.5761	96.6883
	500	72.5811	49.2546	96.4039
	1000	84.6828	50.7746	95.9569

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก

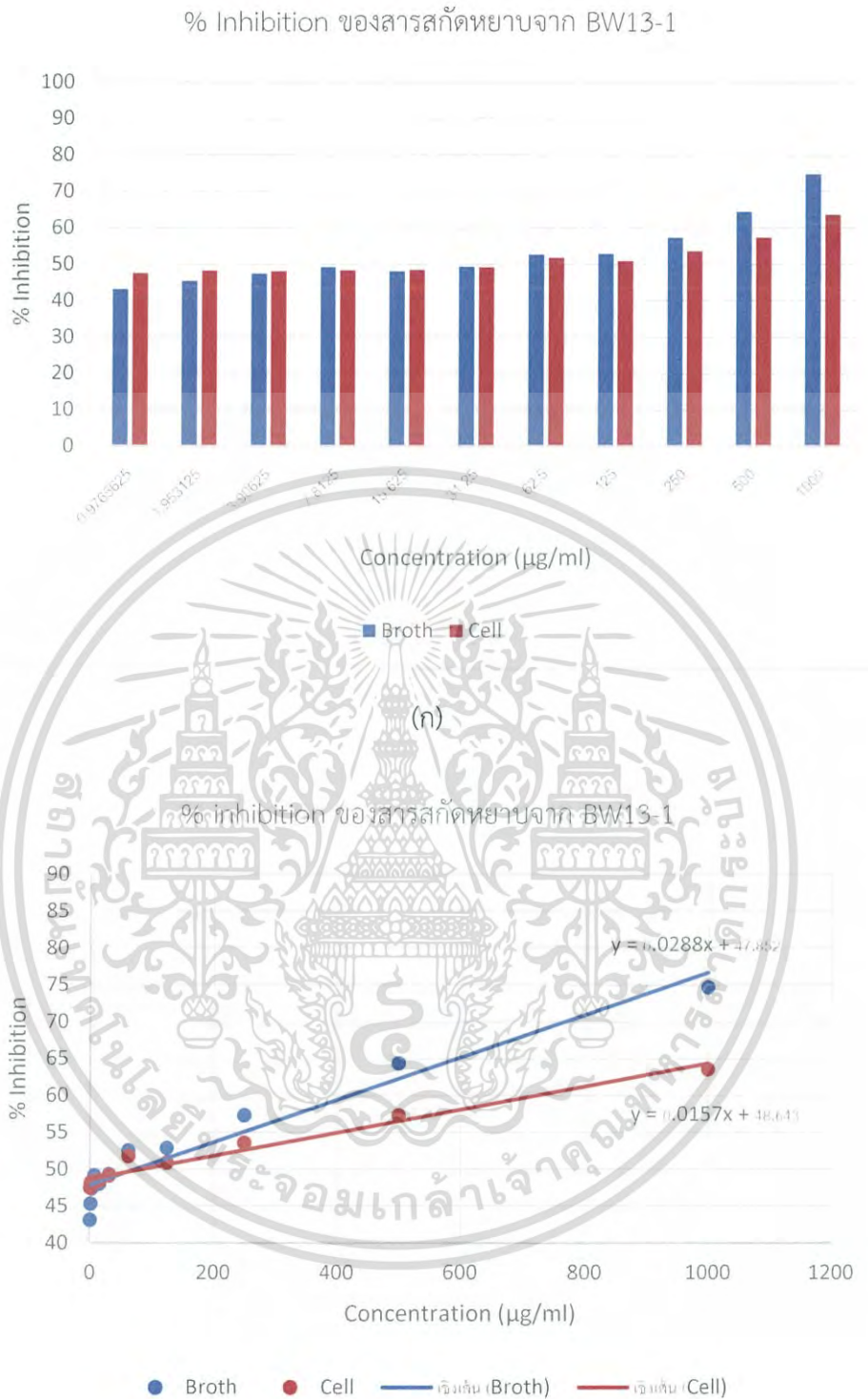
และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ค่า % inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ของไอโซเลต BW13-1

ไอโซเลต	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	%inhibition (น้ำหมัก)	%inhibition (เซลล์)	% inhibition BHT
BW13-1	0.9765	43.0952	47.4603	56.1357
	1.9531	45.3174	48.1746	57.7001
	3.9062	47.3809	48.0158	61.6619
	7.8125	49.1269	48.2539	68.3462
	15.6250	48.0158	48.4127	72.7752
	31.25	49.2857	49.1269	84.1121
	62.50	52.5396	51.7460	91.2230
	125	52.8571	50.8730	95.3271
	250	57.3015	53.5714	96.6883
	500	64.3650	57.3015	96.4039
1000	74.6825	63.5714	95.9569	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.39 (ก) กราฟแผนภูมิแสดง % inhibition และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของน้ำหมัก และตัวเซลล์ (ข) กราฟเส้นตรง แสดงสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า IC_{50}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ค่า % inhibition ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของสารสกัดหยาบจาก น้ำหมักและเซลล์ของแต่ละไอโซเลต เทียบกับสารมาตรฐาน BHT

ไอโซเลต	% inhibition ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml		
	น้ำหมัก	เซลล์	BHT
PC1-1	51.56	61.80	95.96
PRB2-1	76.28	55.54	95.96
PP3-2	82.50	61.84	95.96
PO4-1	91.76	73.76	95.96
PO5-1	85.54	78.99	95.96
PP8-1	83.98	57.32	95.96
POR10-1	95.87	72.04	95.96
BW5-2	83.82	62.04	95.96
BW13-1	74.68	63.57	95.96

จากผลของ % inhibition พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและตัวเซลล์ให้ % inhibition สูง แต่ไม่พบว่ามีไอโซเลตใดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบที่ได้ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โพรคาริโอต และอาจไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอตด้วย จึงอาจนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอาหารเสริม ซึ่งมีการใช้กับร่างกายมนุษย์โดยตรง ทั้งนี้ต้องผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบในส่วนของน้ำหมักและตัวเซลล์ พิจารณาค่าในรูปแบบความเข้มข้นของสารละลายผลิตภัณฑ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ ค่า IC_{50} สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรงข้างต้น พบว่าในสารสกัดหยาบทั้งในส่วนของน้ำหมักและตัวเซลล์มีค่า IC_{50} ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 สมการเส้นตรง และค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบส่วนน้ำหมักและเซลล์ของแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ส่วนของสารสกัดหยาบ	สมการเส้นตรง	ค่า IC_{50} (mg/ml)
PC1-1	น้ำหมัก	$y = 0.0071x + 46.297$	0.5216
	เซลล์	$y = 0.0151x + 47.344$	0.1759
PRB2-1	น้ำหมัก	$y = 0.0314x + 45.811$	0.1334
	เซลล์	$y = 0.0114x + 45.76$	0.3719
PP3-2	น้ำหมัก	$y = 0.0317x + 52.185$	-
	เซลล์	$y = 0.0129x + 49.601$	0.0309
PO4-1	น้ำหมัก	$y = 0.0444x + 48.655$	0.0303
	เซลล์	$y = 0.0307x + 48.065$	0.0630
PO5-1	น้ำหมัก	$y = 0.0366x + 50.639$	-
	เซลล์	$y = 0.0283x + 50.471$	-
PP8-1	น้ำหมัก	$y = 0.0398x + 45.765$	0.1064
	เซลล์	$y = 0.0149x + 43.414$	0.4420
POR10-1	น้ำหมัก	$y = 0.0571x + 48.225$	0.0311
	เซลล์	$y = 0.0314x + 46.324$	0.1171
BW5-2	น้ำหมัก	$y = 0.0379x + 49.728$	0.0072
	เซลล์	$y = 0.0025x + 48.173$	0.7308
BW13-1	น้ำหมัก	$y = 0.0288x + 47.852$	0.0746
	เซลล์	$y = 0.0157x + 48.643$	0.0864

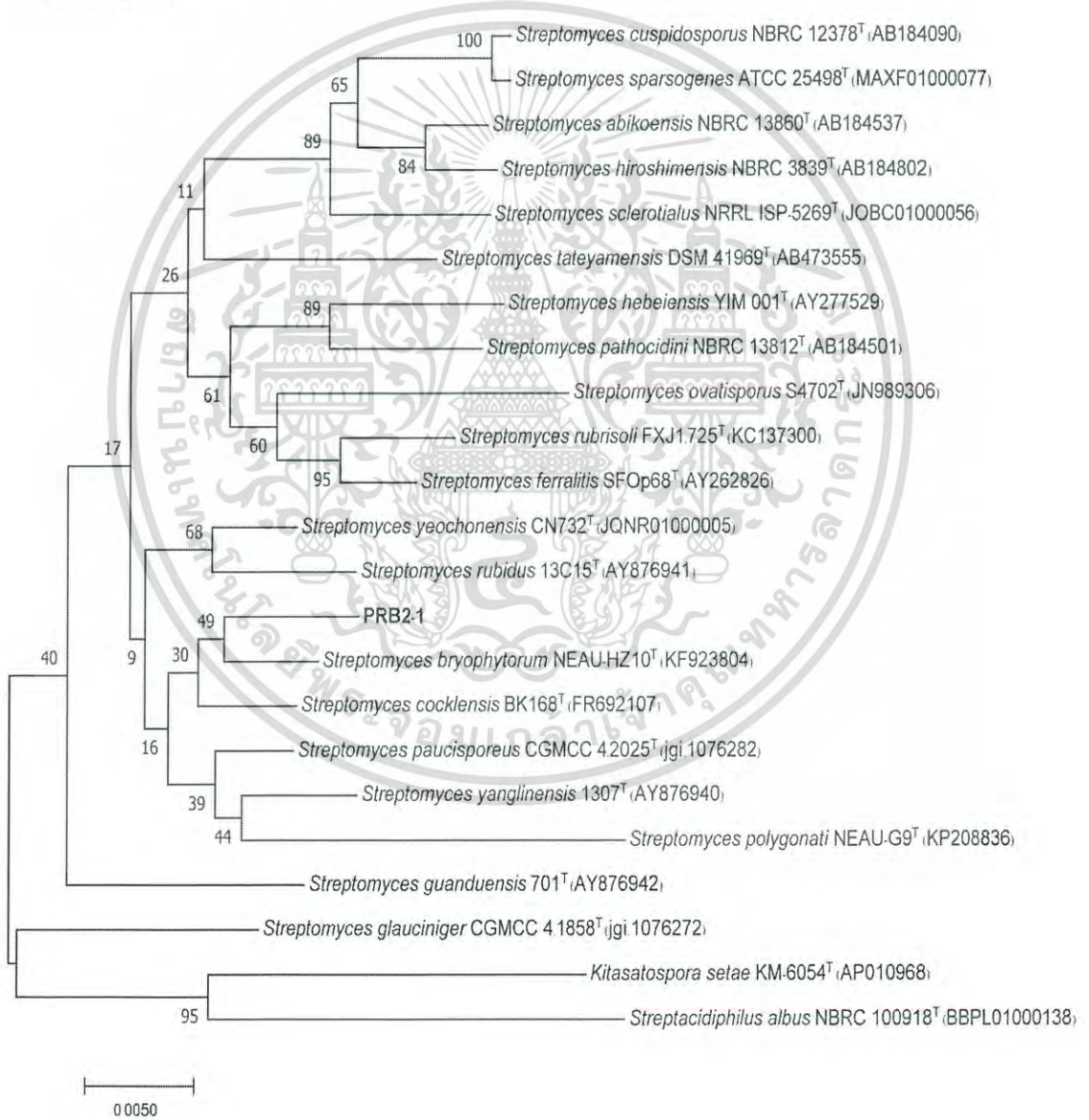
หมายเหตุ - ไม่สามารถหาค่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเบื้องต้น

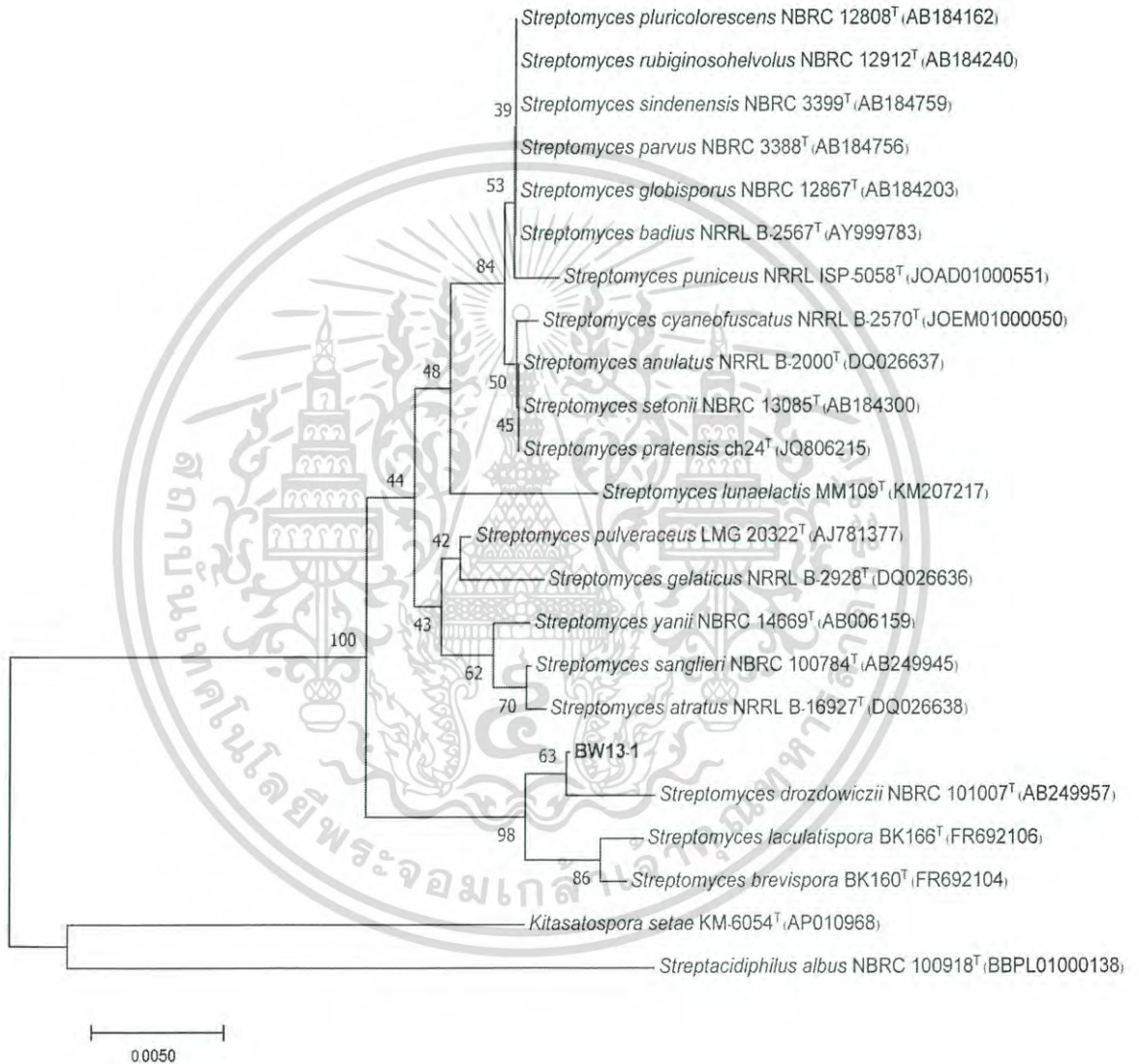
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาน่าสนใจ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่น ดังนี้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PRB2-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces bryophytorum* NEAU-HZ10^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% 16S rRNA gene similarity) ร้อยละ 98.5 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 49 (รูปที่ 4.40) แสดงให้เห็นว่าไอโซเลตดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเป็นสายพันธุ์ใหม่ในสกุล *Streptomyces*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 4.40 แสดงตำแหน่งของเชื้อ PRB2-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

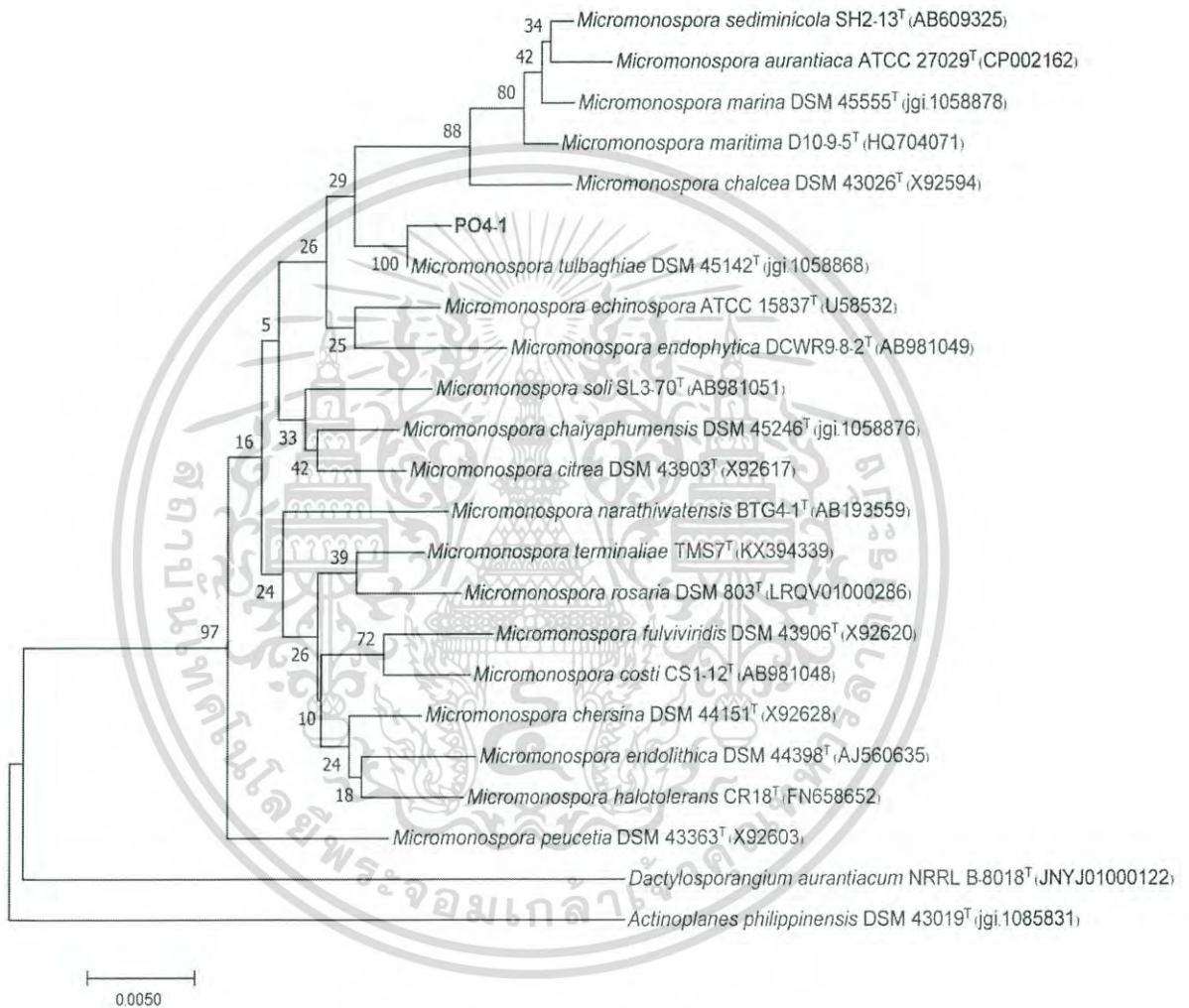
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต BW13-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces drozdowiczii* NBRC 101007^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% 16S rRNA gene similarity) ร้อยละ 99.68 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 63 (รูปที่ 4.41)



รูปที่ 4.41 แสดงตำแหน่งของเชื้อ BW13-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

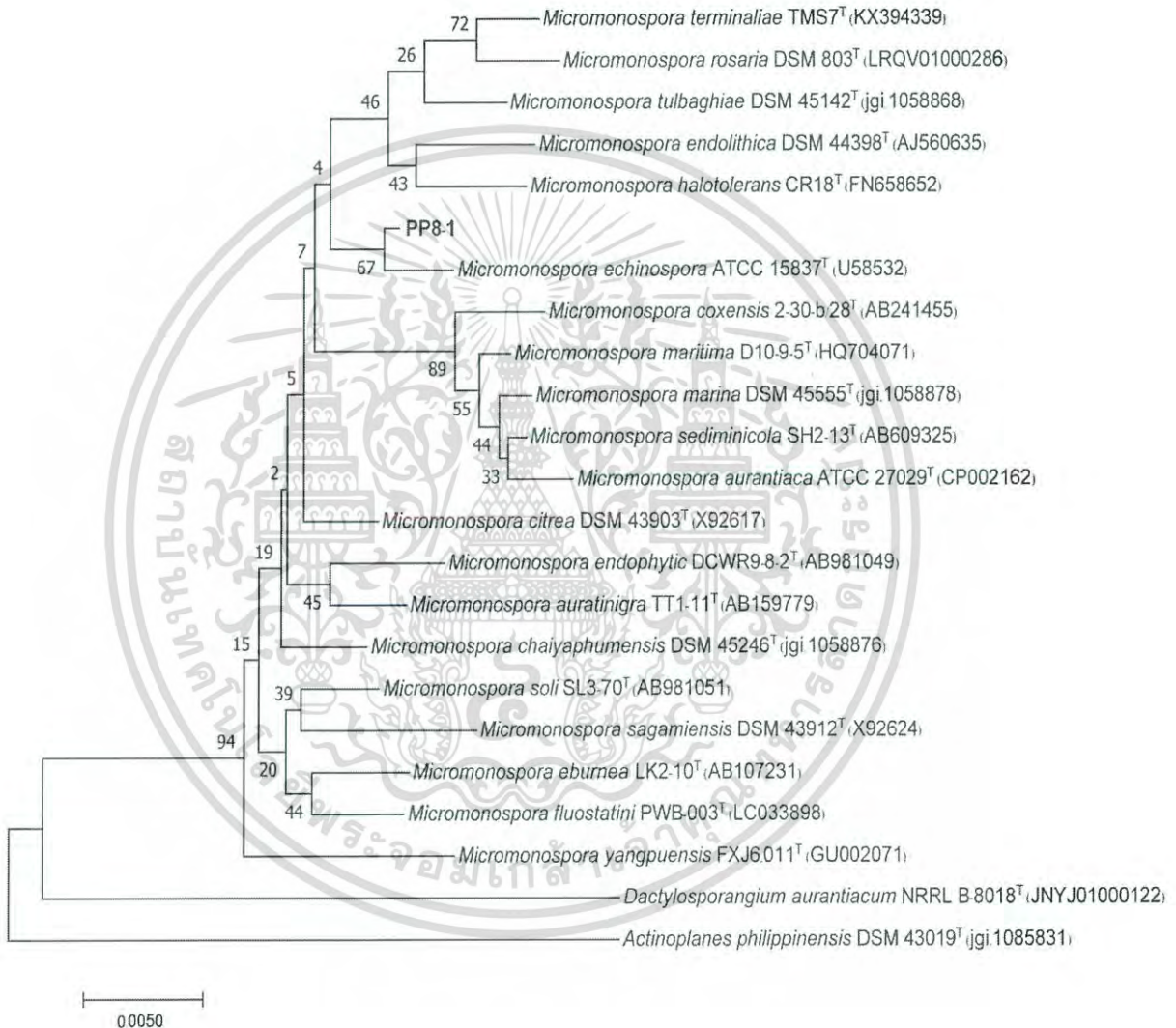
เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PO4-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora tulbaghia* DSM 45142^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% 16S rRNA gene similarity) ร้อยละ 99.82 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 100 (รูปที่ 4.42)



รูปที่ 4.42 แสดงตำแหน่งของเชื้อ PO4-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต PP8-1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora echinospora* ATCC 15837^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% 16S rRNA gene similarity) ร้อยละ 99.66 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนต้นสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 67 (รูปที่ 4.43)



รูปที่ 4.43 แสดงตำแหน่งของเชื้อ PP8-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากพลูด่างและกล้วย ในเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต เมื่อทำการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะสปอร์ สามารถแบ่งได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สปอร์มีสายตรง สั้น สามารถระบุชนิดเบื้องต้นได้ว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* ได้แก่ ไอโซเลต PRB2-1, PRB2-2, PRB2-3, BW13-1 และ BW13-2 โดย PRB2-1, PRB2-2 และ PRB2-3 โคลินีมีลักษณะแข็ง ผิวหน้าเป็นรอยพับ เส้นใยอากาศสีเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมส้ม ส่วน BW13-1 และ BW13-2 โคลินีแข็ง ผิวหน้าคล้ายฝุ่นผง เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหารสีเทา

กลุ่มที่ 2 สปอร์เดี่ยว สามารถระบุชนิดเบื้องต้นได้ว่าอยู่ในสกุล *Micromonospora* ได้แก่ ไอโซเลต PC1-2, PC1-7, PP3-1, PP3-2, PP3-3, PBL6-1, PBL6-4, PBL6-7, PP8-1, PP9-1 และ POR10-1 โคลินีมีขนาดเล็ก มีรอยพับ เส้นใยอาหารสีครีมจนถึงสีน้ำตาล

กลุ่มที่ 3 สปอร์เดี่ยว มีเมือกสีดำคลุมโคลินี สามารถระบุชนิดเบื้องต้นได้ว่าอยู่ในสกุล *Micromonospora* ได้แก่ ไอโซเลต PC1-1, PC1-3, PC1-4, PC1-5, PC1-6, PO4-1, PO5-1, PBL6-2, PBL6-3, PBL6-5, PBL6-6, PBL6-8 และ PO7-1 โคลินีมีขนาดเล็ก เส้นใยอาหารสีครีมจนถึงสีน้ำตาล เมื่อถึงระยะการสร้างสปอร์ จะมีเมือกสีดำขึ้นคลุมโคลินี ผิวหน้าจึงเป็นมันวาว

กลุ่มที่ 4 สร้างสปอร์ยาก ได้แก่ ไอโซเลต BW5-2 โคลินีมีขนาดเล็ก นิ่ม เส้นใยอาหารสีขาว จึงไม่สามารถระบุสกุลได้

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaur (2016) ที่แยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากสะเดาได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต พบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora*

นำตัวแทนกลุ่มมาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น พบว่า ทุกไอโซเลตไม่มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทดสอบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sonashia (2011) ที่ทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีท 30 ไอโซเลตพบว่า มี 28 ไอโซเลตที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ได้ โดยอยู่ในสกุล *Streptomyces* ถึง 53% และ *Micromonospora* เพียง 13% ซึ่งไอโซเลตที่ผู้วิจัยแยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Micromonospora* จึงมีความเป็นไปได้ที่จะไม่พบฤทธิ์

การต้านจุลินทรีย์ ส่วนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำหมักของ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไอโซเลต POR10-1, PO4-1, PO5-1, BW5-2, PP8-1, PP3-2, BW13-1, PRB2-1 และ PC1-1
ไม่มีการแก้ไขใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุใดเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มี % inhibition เท่ากับ 95.8962, 91.7569, 85.5421, 84.6828, 83.9826, 82.7138, 76.2775, 74.6825 และ 51.5569 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเซลล์ของไอโซเลต PO5-1, PO4-1, POR10-1, BW13-1, PP3-2, PC1-1, PP8-1, PRB2-1 และ BW5-2 มี % inhibition เท่ากับ 78.9909, 73.7585, 72.0433, 63.5714, 62.3048, 61.8031, 57.3160, 55.5406 และ 50.7746 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นำไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีจำนวน 4 ไอโซเลต มาระบุชนิดของเชื้อเบื้องต้นโดยการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างสายวิวัฒนาการแล้ว พบว่า

ไอโซเลต PRB2-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces bryophytorum* NEAU-HZ10^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 98.53 และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็น สปีชีส์ใหม่

ไอโซเลต BW13-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces drozdowiczii* NBRC 101007^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.68

ไอโซเลต PO4-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora tulbaghiaie* DSM 45142^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.82

ไอโซเลต PP8-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora echinospora* ATCC 15837^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.66

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. หลังจากทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี Primary screening แล้ว ควรทำการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion เพื่อเป็นการยืนยันผลด้วย
2. นำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดี มาวิเคราะห์หาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น เพื่อทดสอบฤทธิ์อีกครั้ง เนื่องจากในสารสกัดหยาบ อาจมีองค์ประกอบของสารหลายชนิด ทำให้การออกฤทธิ์ของสารสำคัญเป็นไปได้เท่าที่ควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- เกศแก้วกัลยา วงษ์สวัสดิ์, ปพิชญา กาศวิบูลย์ และ สุพิชา แสงสว่าง. (2555). การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสปีท์ที่แยกจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิตติ ท๋าไว. (2557). แอกติโนแบคทีเรียเทคนิคการแยกและคัดเลือกเชื้อ. โรงพิมพ์บริษัทแดนเนิ่กซ์ อินเทอร์เน็ตปอเรชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ. 296 หน้า
- จิราพร ใจตรง, เมหนี มูลศรี และ สุภาพร เนินหอม. (2554). การคัดกรองและการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสปีท์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่แยกจากดินในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดุขฎี พูลสวัสดิ์, อีระพัฒน์ นครพันธ์ และ ปัทมาภรณ์ ศรีสุนทร. (2555). เชื้อแอกติโนมัยสปีท์บนพื้นผิวที่แยกจากต้นข้าว (*Oryza sativa* L.) และกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อนั้น. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นันทวัน เนียมหอม. (2555). ฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสปีท์หายากจากป่าพรุเขตอบอุ่นในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เนตรชนก บัวผิน และ รัชชสุดา ชันทองดี. (2555). ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดตับเต่า โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแห้งของเส้นใยและตัวอย่างแห้งของดอกเห็ด. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ยุวดี มั่นยืน, ยุวดี มาตขาว และ อมรา เก่งการ. (2555). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากแห่น *Lemna acquinotialis*. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วนาพร แซ่อึ้ง. (2559). การสกัดและการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าวไร้เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

วาสิณี ธรรมสถิต, ศุจินันท์ ยาประเสริฐ และ เมธี เอกเสวตอนันต์. (2552). การแยกและการตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดกระบี่. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศรีสกุล ชนะพันธ์. (2553). การแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้. วิทยาศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร

Akshatha, J.V., Prakash, H.S. and Nalini, M.S. (2016). "Actinomycete Endophytes from the Ethno Medicinal Plants of Southern India: Antioxidant Activity and Characterization Studies." *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 6 : 166-172

Beltrametti, F., Lazzarini, A., Brunati, C., Selva, E. and Marinelli, F. (2003). "Production of Demannosyl-A40926 by a *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 Mutant Strain." *The Journal of Antibiotics*. 56(3) : 310-313.

Bronwyn, K.M. and Meyers, P.R. (2010). "*Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60 : 1328-1333.

Chaudhary, S. H. , Yadav, J. , Shrivastava, A. R. , Singh, S. and Gopalan, N. (2013) . "Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India) ." *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 4(2) : 118-123.

Li, C. et al. (2016). "*Streptomyces bryophytorum* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from moss (Bryophyta)." *Antonie van Leeuwenhoek*. 9 : 1209-1215.

Semêdo, L. T. A. S. et al. (2004). "*Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. " *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 : 1323-1328.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Navneet, K. (2016). "Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Characterization and anti-microbial activity." *International Journal of Advanced Research*. 4(6) : 676-684

Passari, A.K., Mishra, V.K., Saikia, R., Gupta, V.K. and Singh, B.P. (2015). "Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential." *Frontiers in Microbiology*. 6 : 273

Qiu, P., et al. (2015). "Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China." *Chinese Journal of Natural Medicines*. 13(12) : 0942-0953

Radha, S. and A.K. Dubey. (2015). "Endophytic Actinomycetes as Emerging Source for Therapeutic Compounds." *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 5(2) : 106-116

Sheng, Q., et al. (2009). "Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna China." *Applied and Environmental Microbiology*. 75(19) : 6176-6186

Sonashia, V. and N.M. Kamat. (2011). "Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(2) : 223-228

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran, W. and Phutdhawong, S.W. (2014). "Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 (04) : 008-013

Zaidan, M.R.S., Noor Rain, A., Badrul, A.R., Adlin, A., Norazah, A. and Zakiah, I. (2005).

"In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method." *Tropical Biomedicine*. 22(2) : 165-70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract-Malt extract agar (ISP2)

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 7.3		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Starch Casein Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ

Soluble starch	10	กรัม
KNO ₃	2	กรัม
Casein sodium caseinate	0.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05	กรัม
NaCl	2	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nystatin (ละลายใน DMSO) 100 มิลลิกรัม

Mueller-Hinton Agar (MHA)

ผงอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำเร็จรูป	38	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tryptic Soy Agar (TSA)

ผงอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป TSB	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

กระดาศสีมาตรฐาน

กระดาศสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color system, Mundie 1995)

Centroid	Munsell	RGB	Swatch
Red, Pink			
1 Vivid Pink	1r 8.0 13.0	#FF7E93	
2 Strong Pink	1.2r 6.9 8.2	#FD7B7C	
3 Deep Pink	2.1r 6.0 11.1	#F3545E	
4 Light Pink	2.6r 8.5 4.0	#FFBCAD	
5 Moderate Pink	2.8r 7.2 5.3	#EE9086	
6 Dark Pink	2.7r 5.9 6.1	#C76864	
7 Pale Pink	2.0r 8.7 2.1	#FFCBBB	
8 Grayish Pink	2.6r 7.2 2.3	#CF9B8F	
9 Pinkish White	5.8r 9.0 0.8	#F9DBC8	
10 Pinkish Gray	9.8r 7.4 1.0	#C8A696	
11 Vivid Red	5.0r 3.9 15.4	#C10020	
12 Strong Red	4.0r 4.4 12.1	#BF2233	
13 Deep Red	5.1r 2.8 10.1	#7B001C	
14 Very Deep Red	6.5r 1.7 8.4	#4F0014	
15 Moderate Red	3.8r 4.4 9.1	#AB343A	
16 Dark Red	4.0r 2.8 6.8	#681C23	
17 Very Dark Red	2.0r 1.2 4.8	#320A18	
18 Light Grayish Red	5.3r 5.9 3.5	#B17267	
19 Grayish Red	4.0r 4.4 4.8	#8C4743	
20 Dark Grayish Red	2.9r 2.7 2.1	#482A2A	
21 Blackish Red	3.9r 0.8 1.7	#1F0E11	
22 Reddish Gray	7.0r 5.4 1.3	#8B6C62	
23 Dark Reddish Gray	6.0r 3.4 1.0	#523C36	
24 Reddish Black	2.0r 0.9 0.9	#1E1112	
Yellowish Pink			
25 Vivid Yellowish Pink	8.0r 8.0 13.0	#FF845C	
26 Strong Yellowish Pink	8.4r 7.0 9.5	#FF7A5C	
27 Deep Yellowish Pink	5.5r 5.8 12.1	#F64A46	

28 Light Yellowish Pink	1.9yr 8.2 4.6	#FFB28B
29 Moderate Yellowish Pink	0.7yr 7.2 4.9	#EE9374
30 Dark Yellowish Pink	7.0r 6.0 6.1	#CC6C5C
31 Pale Yellowish Pink	4.2yr 8.6 2.2	#FFC8A8
32 Grayish Yellowish Pink	1.3yr 7.2 2.4	#D39B85



Reddish Orange, Reddish Brown

33 Brownish Pink	7.0yr 7.1 2.3	#CD9A7B
34 Vivid Reddish Orange	9.8r 5.4 14.5	#F13A13
35 Strong Reddish Orange	9.3r 5.4 12.2	#FFB961
36 Deep Reddish Orange	9.2r 3.9 12.1	#A91D11
37 Moderate Reddish Orange	9.3r 5.5 9.2	#D35339
38 Dark Reddish Orange	9.3r 4.0 9.1	#9B2F1F
39 Grayish Reddish Orange	0.4yr 5.4 6.2	#B85D43
40 Strong Reddish Brown	0.3yr 3.1 9.9	#7F180D
41 Deep Reddish Brown	1.6yr 1.5 8.3	#490005
42 Light Reddish Brown	0.5yr 5.5 4.1	#AA6651
43 Moderate Reddish Brown	9.0r 3.4 5.2	#712F26
44 Dark Reddish Brown	9.6r 1.3 3.6	#321011
45 Light Grayish Reddish Brown	2.9yr 5.4 2.3	#966A57
46 Grayish Reddish Brown	9.0r 3.4 2.4	#5E3830
47 Dark Grayish Reddish Brown	9.0r 2.0 2.0	#371F1C



Orange Brown

48 Vivid Orange	4.1yr 6.5 15.0	#FF6800
49 Brilliant Orange	4.0yr 9.0 12.0	#FFB841
50 Strong Orange	4.3yr 6.5 12.2	#FF6F1A
51 Deep Orange	4.1yr 5.1 11.3	#C34D0A
52 Light Orange	4.8yr 7.8 7.2	#FFA161
53 Moderate Orange	4.6yr 6.5 8.2	#E8793E
54 Brownish Orange	4.1yr 5.0 8.0	#B15124
55 Strong Brown	4.6yr 3.5 7.6	#753313
56 Deep Brown	5.6yr 2.4 5.2	#4D220E
57 Light Brown	5.4yr 5.4 4.8	#A86540
58 Moderate Brown	5.6yr 3.5 3.9	#673923



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้
 60 Light Grayish Brown 6.4yr 5.4 2.2 เจ้าของ #946B54

61 Grayish Brown	5.5yr 3.5 1.8	#5A3D30
62 Dark Grayish Brown	5.5yr 2.0 1.5	#32221A
63 Light Brownish Gray	7.0yr 5.4 1.2	#8B6D5C
64 Brownish Gray	5.65r 3.4 0.9	#503D33
65 Brownish Black	7.8yr 0.6 0.9	#140F0B



Orange Yellow, Yellowish Brown

66 Vivid Orange Yellow	8.6yr 7.3 15.2	#FF8E00
67 Brilliant Orange Yellow	0.1y 8.1 10.5	#FFB02E
68 Strong Orange Yellow	9.1yr 7.1 11.6	#FF8E0D
69 Deep Orange Yellow	8.6yr 6.0 12.1	#D76E00
70 Light Orange Yellow	9.4yr 8.3 6.8	#FFB961
71 Moderate Orange Yellow	8.7yr 7.2 8.3	#F7943C
72 Dark Orange Yellow	9.3yr 6.0 7.9	#C37629
73 Pale Orange Yellow	9.2yr 8.7 4.4	#FFCA86
74 Strong Yellowish Brown	8.8yr 4.6 8.5	#95500C
75 Deep Yellowish Brown	8.8yr 3.1 5.0	#593315
76 Light Yellowish Brown	8.7yr 6.5 5.0	#BB8B54
77 Moderate Yellowish Brown	9.5yr 4.4 3.9	#7D512D
78 Dark Yellowish Brown	9.4yr 2.3 3.3	#3F2512
79 Light Grayish Yellowish Brown	9.7yr 6.4 2.5	#B48764
80 Grayish Yellowish Brown	9.5yr 4.6 2.1	#785840
81 Dark Grayish Yellowish Brown	8.8yr 2.5 1.6	#3D2B1F



Yellow, Olive Brown

82 Vivid Yellow	3.3y 8.0 14.3	#FFB300
83 Brilliant Yellow	4.4y 8.7 8.9	#FFCF40
84 Strong Yellow	3.7y 7.2 9.3	#E59E1F
85 Deep Yellow	3.7y 5.9 9.1	#B57900
86 Light Yellow	4.3y 8.8 6.8	#FFD35F
87 Moderate Yellow	3.8y 7.1 6.5	#D79D41
88 Dark Yellow	3.9y 6.0 6.4	#B07D2B
89 Pale Yellow	4.7y 9.0 3.8	#FFDB8B
90 Grayish Yellow	4.4y 7.2 3.8	#CEA262
91 Dark Grayish Yellow	3.8y 5.9 4.0	#A47C45



เอกสาร 92 Yellowish White ไร้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา 4.5y 9.2 1.2 ไม่นาน #FFE2B7 ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่า 93 Yellowish Gray ทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและ 3.8y 7.4 1.4 เจ้าของ #CAA885 คุกครั้งที่มีการนำไปใช้

94 Light Olive Brown	2.1y 4.9 7.9	#945D0B
95 Moderate Olive Brown	2.7y 3.6 5.5	#64400F
96 Dark Olive Brown	2.0y 1.9 2.2	#302112

Greenish Yellow, Olive

97 Vivid Greenish Yellow	9.1y 8.2 12.0	#F4C800
98 Brilliant Greenish Yellow	9.8y 8.8 9.5	#FFDC33
99 Strong Greenish Yellow	9.2y 7.2 9.2	#CCA817
100 Deep Greenish Yellow	9.2y 5.9 9.2	#9F8200
101 Light Greenish Yellow	9.8y 8.9 7.0	#FFDE5A
102 Moderate Greenish Yellow	9.5y 7.1 6.5	#C4A43D
103 Dark Greenish Yellow	9.4y 5.9 6.3	#9B8127
104 Pale Greenish Yellow	9.5y 9.0 4.2	#FFDF84
105 Grayish Greenish Yellow	9.0y 7.2 3.9	#C4A55F
106 Light Olive	8.2y 5.1 5.6	#846A20
107 Moderate Olive	7.6y 3.8 5.4	#5E490F
108 Dark Olive	8.9y 2.4 3.1	#362C12
109 Light Grayish Olive	7.85y 5.5 2.5	#8B734B
110 Grayish Olive	8.0y 3.6 2.0	#52442C
111 Dark Grayish Olive	9.7y 2.0 1.8	#2B2517
112 Light Olive Gray	6.9y 5.5 1.3	#887359
113 Olive Gray	8.1y 3.5 0.9	#4D4234
114 Olive Black	9.0y 1.1 0.9	#121910

Yellow Green, Olive Green

115 Vivid Yellowish Green	5.4gy 6.8 11.2	#93AA00
116 Brilliant Yellow Green	4.9gy 8.2 9.1	#CED23A
117 Strong Yellow Green	5.4gy 6.0 8.7	#7F8F18
118 Deep Yellow Green	7.4gy 4.2 7.1	#425E17
119 Light Yellow Green	5.0gy 8.4 5.6	#DCD36A
120 Moderate Yellow Green	4.8gy 6.0 5.0	#8B8940
121 Pale Yellowish Green	3.4gy 8.7 2.4	#F0D698
122 Grayish Yellowish Green	4.4gy 6.0 2.3	#90845B
123 Strong Olive Green	4.0gy 3.0 11.0	#0A4500
124 Deep Olive Green	4.0gy 1.5 11.0	#142300
125 Moderate Olive Green	5.7gy 3.6 4.8	#434B1B
126 Dark Olive Green	8.0gy 2.2 3.6	#232C16



127 Grayish Olive Green	4.6gy 3.5 2.0	#48442D
128 Dark Grayish Olive Green	5.4gy 2.0 1.8	#27261A
129 Vivid Yellowish Green	1.1g 5.9 11.2	#379931

Yellowish Green

130 Brilliant Yellowish Green	0.3g 7.7 8.6	#8CCB5E
131 Strong Yellowish Green	0.4g 5.4 8.7	#478430
132 Deep Yellowish Green	0.9g 3.5 9.0	#00541F
133 Very Deep Yellowish Green	10.0gy 1.5 11.0	#002800
134 Very Light Yellowish Green	0.2g 8.6 4.6	#C6DF90
135 Light Yellowish Green	0.7g 7.4 5.2	#007BA7
136 Moderate Yellowish Green	0.5g 5.5 4.8	#657F4B
137 Dark Yellowish Green	0.6g 3.5 5.0	#304B26
138 Very Dark Yellowish Green	0.3g 1.8 4.3	#132712

Green

139 Vivid Green	3.2g 4.9 11.1	#007D34
140 Brilliant Green	6.2g 6.5 8.3	#47A76A
141 Strong Green	5.8g 4.4 8.7	#006B3C
142 Deep Green	5.1g 3.0 8.1	#004524
143 Very Light Green	6.5g 7.8 4.9	#98C793
144 Light Green	6.0g 6.4 5.1	#719B6E
145 Moderate Green	6.3g 4.5 5.1	#386646
146 Dark Green	6.6g 2.8 4.6	#203A27
147 Very Dark Green	8.0g 1.8 3.0	#16251C
148 Very Pale Green	7.3g 8.8 1.9	#D8DEBA
149 Pale Green	7.6g 6.4 1.7	#8D917A
150 Grayish Green	8.8g 4.5 1.8	#575E4E
151 Dark Greenish Yellowish Green	1.0bg 2.9 1.8	#313830
152 Blackish Green	10.0g 1.0 1.4	#141613
153 Greenish White	10.0g 9.2 0.8	#F5E6CB
154 Light Greenish Gray	3.0g 7.5 0.9	#BAAF96
155 Greenish Gray	7.5g 5.5 1.0	#7A7666
156 Dark Greenish Gray	1.5bg 3.5 0.9	#45433B
157 Greenish Black	8.7g 1.0 0.7	#181513

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ **Bluish Green** นั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่า **158. Vivid Bluish Green** จะมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและ 5.0bg 5.0 13.0g ของ #00836E ก็คงมีการนำไปใช้

159 Brilliant Bluish Green	2.9bg 6.0 9.6	#009B76
160 Strong Bluish Green	4.6bg 4.5 8.5	#006D5B
161 Deep Bluish Green	2.8bg 2.4 8.3	#00382B
162 Very Light Bluish Green	4.4bg 8.3 4.6	#A0D6B4
163 Light Bluish Green	4.6bg 6.5 4.9	#669E85
164 Moderate Bluish Green	4.6bg 4.5 5.0	#2F6556
165 Dark Bluish Green	4.9bg 2.7 5.0	#013A33
166 Very Dark Bluish Green	3.6bg 1.2 4.0	#001D18
167 Vivid Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7



Greenish Blue

168 Brilliant Greenish Blue	4.6b 5.9 7.7	#2A8D9C
169 Strong Greenish Blue	4.9b 4.5 8.4	#00677E
170 Deep Greenish Blue	5.0b 5.0 13.0	#007BA7
171 Very Light Greenish Blue	4.0b 8.0 4.0	#A3C6C0
172 Light Greenish Blue	4.5b 6.5 5.4	#649A9E
173 Moderate Greenish Blue	4.7b 4.5 5.2	#30626B
174 Dark Greenish Blue	3.7b 2.7 5.0	#003841
175 Very Dark Greenish Blue	5.0b 1.5 3.6	#022027



Blue

176 Vivid Blue	5.0b 5.0 14.0	#007CAD
177 Brilliant Blue	1.6pb 5.9 9.4	#4285B4
178 Strong Blue	2.9pb 4.1 10.4	#00538A
179 Deep Blue	2.8pb 2.5 7.9	#002F55
180 Very Light Blue	2.7pb 7.9 6.0	#A6BDD7
181 Light Blue	1.6pb 6.4 6.9	#6C92AF
182 Moderate Blue	3.0pb 4.3 6.8	#395778
183 Dark Blue	2.2pb 1.7 5.5	#002137
184 Very Pale Blue	1.5pb 8.3 3.3	#C1CACA
185 Pale Blue	0.6pb 6.5 2.6	#919192
186 Grayish Blue	0.2pb 4.2 3.0	#4A545C
187 Dark Grayish Blue	9.2b 2.7 2.0	#2C3337
188 Blackish Blue	9.8b 1.3 1.5	#161A1E
189 Bluish White	9.2b 9.1 1.2	#F9DFCF



เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของสำนักงานเพื่อการศึกษา 8.2b 7.5 1.0 มอนูญา #BEADA1 ใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา
ไม่ว่าในรูปแบบใดก็ตาม ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและ 8.9b 5.5 0.9 เจ้าของ #7D746D คุกคามที่มีการนำไปใช้

192 Dark Bluish Gray	0.3pb 3.6 1.1	#464544
193 Bluish Black	9.6b 1.1 0.8	#151719

Purplish Blue

194 Very Purplish Blue	7.8pb 2.0 12.5	#20155E
195 Brilliant Purplish Blue	7.3pb 5.1 9.0	#62639B
196 Strong Purplish Blue	8.0pb 4.0 10.9	#474389
197 Deep Purplish Blue	7.8pb 1.5 8.0	#1A153F
198 Very Light Purplish Blue	7.4pb 7.6 5.2	#BAAC7
199 Light Purplish Blue	7.3pb 6.0 6.5	#837DA2
200 Moderate Purplish Blue	7.9pb 3.5 6.5	#423C63
201 Dark Purplish Blue	8.0pb 1.3 4.3	#1A162A
202 Very Pale Purplish Blue	7.0pb 8.0 3.7	#CBBAC5
203 Pale Purplish Blue	7.0pb 6.0 3.9	#8A7F8E
204 Grayish Purplish Blue	6.9pb 3.4 3.8	#413D51

Violet

205 Vivid Violet	2.0p 5.0 14.0	#884BAE
206 Brilliant Violet	9.9pb 5.1 9.4	#755D9A
207 Strong Violet	0.2p 3.7 10.1	#53377A
208 Deep Violet	1.1p 1.2 8.6	#240935
209 Very Light Violet	2.0p 8.5 7.0	#EEBEF1
210 Light Violet	0.5p 5.6 7.1	#876C99
211 Moderate Violet	1.4p 3.6 7.0	#543964
212 Dark Violet	1.4p 1.3 4.9	#22132B
213 Very Pale Violet	9.7pb 7.9 3.7	#D8B1BF
214 Pale Violet	1.3p 6.0 4.0	#957B8D
215 Grayish Violet	1.2p 3.3 3.9	#46394B

Purple

216 Vivid Purple	6.0p 4.5 14.0	#943391
217 Brilliant Purple	6.0p 7.0 11.0	#DD80CC
218 Strong Purple	6.5p 4.3 9.2	#803E75
219 Deep Purple	6.3p 2.7 9.1	#531A50
220 Very Deep Purple	5.0p 1.5 8.0	#320B35
221 Very Light Purple	6.5p 7.8 5.1	#E3A9BE

222 Light Purple 6.2p 6.5 6.5 #BA7FA2

223 Moderate Purple 6.6p 4.5 7.1 #7F4870



224 Dark Purple	6.3p 2.8 4.9	#472A3F
225 Very Dark Purple	6.9p 1.0 4.5	#230D21
226 Very Pale Purple	5.5p 8.2 3.2	#E6BBC1
227 Pale Purple	7.9p 6.4 3.1	#AE848B
228 Grayish Purple	8.1p 4.5 2.7	#72525C
229 Dark Grayish Purple	0.5rp 2.8 2.0	#452D35
230 Blackish Purple	0.8rp 0.9 1.6	#1D1018
231 Purplish White	2.5rp 9.0 0.8	#FADBC8
232 Light Purplish Gray	0.3rp 7.5 1.1	#C8A99E
233 Purplish Gray	1.0rp 5.5 0.9	#88706B
234 Dark Purplish Gray	1.0rp 3.6 1.0	#564042
235 Purplish Black	9.54p 0.9 0.6	#1B1116

Reddish Purple

236 Vivid Reddish Purple	1.0rp 3.0 14.0	#7E0059
237 Strong Reddish Purple	1.3rp 4.4 10.2	#9A366B
238 Deep Reddish Purple	1.0rp 2.8 9.5	#641349
239 Very Deep Reddish Purple	0.9rp 1.9 8.9	#470736
240 Light Reddish Purple	0.7rp 6.0 6.9	#BB6C8A
241 Moderate Reddish Purple	0.8rp 4.5 7.0	#8C4566
242 Dark Reddish Purple	1.3rp 2.8 4.8	#4F273A
243 Very Dark Reddish Purple	1.5rp 1.0 4.8	#270A1F
244 Pale Reddish Purple	1.3rp 6.0 4.2	#AC7580
245 Grayish Reddish Purple	1.0rp 4.5 4.2	#7D4D5D

Purplish Pink, Purplish Red

246 Brilliant Purplish Pink	6.0rp 8.5 11.0	#FF97BB
247 Strong Purplish Pink	5.6rp 6.8 9.0	#F6768E
248 Deep Purplish Pink	4.4rp 6.0 12.2	#EB5284
249 Light Purplish Pink	4.6rp 8.0 5.5	#FFA8AF
250 Moderate Purplish Pink	4.6rp 6.8 6.7	#E28090
251 Dark Purplish Pink	6.4rp 5.9 7.0	#C76574
252 Pale Purplish Pink	3.7rp 8.4 3.3	#FDBDBA
253 Grayish Purplish Pink	3.7rp 7.0 3.5	#CC9293

254 Vivid Purplish Red 7.6rp 4.9 13.6 #D5265B

255 Strong Purplish Red 7.3rp 4.4 11.4 #B32851



256 Deep Purplish Red	7.3rp 2.6 10.1	#6F0035
257 Very Deep Purplish Red	6.8rp 1.7 8.0	#470027
258 Moderate Purplish Red	7.1rp 4.5 9.0	#A73853
259 Dark Purplish Red	7.1rp 2.7 6.0	#5B1E31
260 Very Dark Purplish Red	6.6rp 0.9 4.8	#28071A
261 Light Grayish Purplish Red	7.8rp 5.9 4.2	#B27070
262 Grayish Purplish Red	7.0rp 4.5 5.1	#8C4852
263 White	2.5pb 9.5 0.2	#FFC9D7
264 Light Gray	6.7y 7.4 0.2	#C2A894
265 Medium Gray	3.3gy 5.4 0.1	#817066
266 Dark Gray	2.5pb 3.5 0.0	#49423D
267 Black	2.5pb 0.8 0.0	#131313



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่เลือกทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PRB2-1 (1228 นิวคลีโอไทด์)

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCCTTTTCGGGGGT
GGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG
GAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCTGGGGATGCATGTTCCCGGGTGAAAGCTCCGGCGG
TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGA
AGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAAC
TCCGGGTCTGCATTGCATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCACGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATAC
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTT
CCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACGCCAG
AAACCCCGGAGACAGGTGCCCCCTTGTGGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTACGCT
CGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTTGCCAGCAG
GCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGA
GCTGCGATACCGTGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PO4-1 (1098 นิวคลีโอไทด์)

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGG
 GGTAICTGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAGGCTTTGGGATAACCC
 CGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTTGCACCGCATGGTGTTTGGTGGAAAGTTTTTC
 GGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGAC
 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
 GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCA
 GAAGAAGCGCCGGCCAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCC
 GGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCGACTGTGAAAACCCGCAGCTC
 AACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT
 GTAGCGGTGAAATGCGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCG
 AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 TGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTA
 AGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGG
 CCGCAAACTGTCAGAGATGGCAGGTCTTCGGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC
 AACTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGATCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCA
 GCGCGTTATGGCGGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PP8-1 (1223 นิวคลีโอไทด์)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGG
 G TACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAGGCTTTGGGATAACCCC
 GGGAAACCGGGGCTAATACCGAATATGACCTCCGATCGCATGGTTGGTGGTGGAAAGTTTTTCG
 GCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACG
 GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG
 ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAG
 AAGAAGCGCCGGCCAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCG
 GATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCAGCTCA
 ACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGT
 AAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGC
 GCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
 GCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCG
 CAAAACCTGTCAGAGATGGCAGGTCCTTCGGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC
 TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCG
 CGTTATGGCGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCG
 ATACCGTGAGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BW13-1 (1240 นิวคลีโอไทด์)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGG
 GTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCC
 TGAAACGGGGTCTAATACCGGATAATACTTTCTCCCTCCTGGGAGAAGGTTGAAAGCTCCGGC
 GGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGAC
 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
 GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCA
 GAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCG
 GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTA
 ACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGT
 TCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
 CAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCG
 GAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC
 TCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCA
 TGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
 CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAT
 GAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบและสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต PC1-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.809	0.887	0.886	0.111
	เซลล์	0.770	0.814	0.775	0.097
1.9531	น้ำหมัก	0.836	0.844	0.846	0.093
	เซลล์	0.827	0.743	0.754	0.114
3.9062	น้ำหมัก	0.791	0.826	0.819	0.115
	เซลล์	0.823	0.856	0.773	0.106
7.8125	น้ำหมัก	0.763	0.795	0.779	0.103
	เซลล์	0.823	0.856	0.773	0.106
15.625	น้ำหมัก	0.838	0.794	0.813	0.107
	เซลล์	0.845	0.812	0.797	0.109
31.25	น้ำหมัก	0.786	0.772	0.764	0.086
	เซลล์	0.794	0.764	0.795	0.097
62.5	น้ำหมัก	0.763	0.835	0.799	0.105
	เซลล์	0.807	0.800	0.804	0.097
125	น้ำหมัก	0.794	0.799	0.808	0.100
	เซลล์	0.744	0.715	0.759	0.112
250	น้ำหมัก	0.792	0.791	0.766	0.160
	เซลล์	0.728	0.738	0.733	0.112
500	น้ำหมัก	0.757	0.784	0.768	0.108
	เซลล์	0.716	0.742	0.723	0.111
1,000	น้ำหมัก	0.754	0.779	0.757	0.111
	เซลล์	0.627	0.628	0.666	0.120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาดจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต PRB2-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสารสกัดหยาด	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.769	0.788	0.842	0.131
	เซลล์	0.744	0.810	0.785	0.093
1.9531	น้ำหมัก	0.776	0.770	0.776	0.092
	เซลล์	0.797	0.799	0.755	0.117
3.9062	น้ำหมัก	0.751	0.787	0.795	0.110
	เซลล์	0.787	0.767	0.726	0.155
7.8125	น้ำหมัก	0.736	0.763	0.753	0.106
	เซลล์	0.806	0.791	0.794	0.125
15.625	น้ำหมัก	0.790	0.763	0.813	0.126
	เซลล์	0.660	0.785	0.793	0.104
31.25	น้ำหมัก	0.752	0.737	0.723	0.090
	เซลล์	0.787	0.753	0.784	0.101
62.5	น้ำหมัก	0.709	0.771	0.742	0.107
	เซลล์	0.804	0.779	0.779	0.097
125	น้ำหมัก	0.725	0.721	0.727	0.108
	เซลล์	0.754	0.755	0.761	0.111
250	น้ำหมัก	0.678	0.687	0.667	0.104
	เซลล์	0.713	0.765	0.750	0.118
500	น้ำหมัก	0.597	0.641	0.613	0.132
	เซลล์	0.699	0.754	0.712	0.130
1,000	น้ำหมัก	0.452	0.559	0.514	0.158
	เซลล์	0.656	0.692	0.706	0.141

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต PP3-2

ความเข้มข้น	ส่วนของสาร สกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.765	0.728	0.746	0.16
	เซลล์	0.747	0.739	0.743	0.113
1.9531	น้ำหมัก	0.800	0.752	0.776	0.107
	เซลล์	0.770	0.775	0.772	0.093
3.9062	น้ำหมัก	0.755	0.800	0.777	0.106
	เซลล์	0.805	0.784	0.794	0.089
7.8125	น้ำหมัก	0.746	0.759	0.752	0.093
	เซลล์	0.743	0.765	0.754	0.086
15.625	น้ำหมัก	0.768	0.723	0.723	0.116
	เซลล์	0.802	0.805	0.803	0.090
31.25	น้ำหมัก	0.726	0.710	0.718	0.095
	เซลล์	0.738	0.745	0.741	0.087
62.5	น้ำหมัก	0.718	0.819	0.718	0.104
	เซลล์	0.747	0.812	0.747	0.087
125	น้ำหมัก	0.680	0.725	0.702	0.108
	เซลล์	0.772	0.785	0.778	0.098
250	น้ำหมัก	0.620	0.623	0.621	0.113
	เซลล์	0.715	0.782	0.715	0.125
500	น้ำหมัก	0.522	0.556	0.539	0.133
	เซลล์	0.770	0.742	0.742	0.162
1,000	น้ำหมัก	0.404	0.389	0.396	0.164
	เซลล์	0.713	0.703	0.708	0.201

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ

ไอโซเลต PO4-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.722	0.799	0.846	0.108
	เซลล์	0.786	0.814	0.841	0.100
1.9531	น้ำหมัก	0.813	0.780	0.798	0.092
	เซลล์	0.840	0.843	0.821	0.122
3.9062	น้ำหมัก	0.775	0.788	0.787	0.113
	เซลล์	0.829	0.811	0.826	0.119
7.8125	น้ำหมัก	0.671	0.669	0.655	0.153
	เซลล์	0.837	0.827	0.823	0.143
15.625	น้ำหมัก	0.799	0.782	0.788	0.108
	เซลล์	0.828	0.812	0.804	0.114
31.25	น้ำหมัก	0.758	0.763	0.761	0.089
	เซลล์	0.823	0.763	0.800	0.117
62.5	น้ำหมัก	0.729	0.772	0.738	0.111
	เซลล์	0.812	0.804	0.825	0.127
125	น้ำหมัก	0.718	0.727	0.738	0.113
	เซลล์	0.808	0.772	0.795	0.168
250	น้ำหมัก	0.663	0.660	0.646	0.134
	เซลล์	0.768	0.778	0.767	0.235
500	น้ำหมัก	0.547	0.577	0.549	0.186
	เซลล์	0.752	0.766	0.738	0.350
1,000	น้ำหมัก	0.390	0.400	0.383	0.274
	เซลล์	0.964	0.903	0.937	0.556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต PO5-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสาร สกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.781	0.811	0.816	0.122
	เซลล์	0.758	0.832	0.779	0.108
1.9531	น้ำหมัก	0.819	0.809	0.783	0.097
	เซลล์	0.804	0.808	0.774	0.113
3.9062	น้ำหมัก	0.752	0.803	0.790	0.109
	เซลล์	0.777	0.792	0.731	0.139
7.8125	น้ำหมัก	0.742	0.766	0.760	0.102
	เซลล์	0.721	0.742	0.749	0.129
15.625	น้ำหมัก	0.780	0.768	0.741	0.116
	เซลล์	0.795	0.768	0.689	0.102
31.25	น้ำหมัก	0.730	0.729	0.705	0.086
	เซลล์	0.782	0.748	0.766	0.101
62.5	น้ำหมัก	0.717	0.766	0.731	0.117
	เซลล์	0.790	0.760	0.772	0.104
125	น้ำหมัก	0.717	0.695	0.709	0.115
	เซลล์	0.764	0.730	0.723	0.104
250	น้ำหมัก	0.622	0.651	0.636	0.126
	เซลล์	0.738	0.723	0.681	0.123
500	น้ำหมัก	0.557	0.576	0.564	0.168
	เซลล์	0.645	0.658	0.646	0.166
1,000	น้ำหมัก	0.432	0.464	0.453	0.240
	เซลล์	0.595	0.563	0.550	0.271

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต PP8-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสาร สกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.701	0.754	0.789	0.112
	เซลล์	0.724	0.790	0.752	0.090
1.9531	น้ำหมัก	0.739	0.733	0.681	0.094
	เซลล์	0.791	0.813	0.756	0.103
3.9062	น้ำหมัก	0.716	0.752	0.734	0.105
	เซลล์	0.782	0.748	0.714	0.106
7.8125	น้ำหมัก	0.705	0.719	0.697	0.104
	เซลล์	0.783	0.765	0.748	0.128
15.625	น้ำหมัก	0.738	0.721	0.722	0.107
	เซลล์	0.783	0.749	0.766	0.104
31.25	น้ำหมัก	0.692	0.675	0.668	0.086
	เซลล์	0.745	0.725	0.749	0.101
62.5	น้ำหมัก	0.682	0.707	0.679	0.100
	เซลล์	0.771	0.750	0.736	0.129
125	น้ำหมัก	0.672	0.667	0.675	0.106
	เซลล์	0.748	0.705	0.737	0.103
250	น้ำหมัก	0.602	0.608	0.590	0.110
	เซลล์	0.726	0.718	0.712	0.128
500	น้ำหมัก	0.522	0.556	0.524	0.141
	เซลล์	0.672	0.710	0.693	0.121
1,000	น้ำหมัก	0.380	0.387	0.373	0.188
	เซลล์	0.643	0.637	0.656	0.144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต POR10-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.727	0.756	0.775	0.106
	เซลล์	0.717	0.776	0.737	0.092
1.9531	น้ำหมัก	0.745	0.752	0.752	0.091
	เซลล์	0.772	0.772	0.714	0.113
3.9062	น้ำหมัก	0.699	0.734	0.744	0.103
	เซลล์	0.750	0.725	0.741	0.113
7.8125	น้ำหมัก	0.691	0.739	0.709	0.103
	เซลล์	0.736	0.754	0.734	0.130
15.625	น้ำหมัก	0.746	0.711	0.731	0.112
	เซลล์	0.783	0.731	0.730	0.105
31.25	น้ำหมัก	0.714	0.695	0.668	0.099
	เซลล์	0.736	0.696	0.731	0.099
62.5	น้ำหมัก	0.661	0.708	0.694	0.136
	เซลล์	0.755	0.731	0.742	0.105
125	น้ำหมัก	0.634	0.656	0.654	0.162
	เซลล์	0.731	0.714	0.721	0.123
250	น้ำหมัก	0.556	0.568	0.540	0.197
	เซลล์	0.720	0.713	0.724	0.228
500	น้ำหมัก	0.435	0.459	0.548	0.451
	เซลล์	0.712	0.790	0.677	0.455
1,000	น้ำหมัก	0.334	0.359	0.317	0.311
	เซลล์	0.673	0.687	0.656	0.329

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต BW5-2

ความเข้มข้น	ส่วนของสาร สกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.702	0.708	0.743	0.109
	เซลล์	0.683	0.711	0.701	0.101
1.9531	น้ำหมัก	0.706	0.701	0.703	0.120
	เซลล์	0.685	0.699	0.698	0.118
3.9062	น้ำหมัก	0.680	0.697	0.712	0.110
	เซลล์	0.729	0.647	0.696	0.111
7.8125	น้ำหมัก	0.661	0.685	0.678	0.103
	เซลล์	0.699	0.679	0.684	0.134
15.625	น้ำหมัก	0.684	0.680	0.682	0.107
	เซลล์	0.732	0.703	0.709	0.105
31.25	น้ำหมัก	0.645	0.651	0.642	0.089
	เซลล์	0.699	0.684	0.718	0.099
62.5	น้ำหมัก	0.613	0.663	0.639	0.099
	เซลล์	0.714	0.713	0.718	0.099
125	น้ำหมัก	0.604	0.610	0.609	0.101
	เซลล์	0.711	0.678	0.694	0.098
250	น้ำหมัก	0.533	0.528	0.530	0.104
	เซลล์	0.711	0.698	0.694	0.126
500	น้ำหมัก	0.419	0.441	0.429	0.117
	เซลล์	0.707	0.715	0.698	0.128
1,000	น้ำหมัก	0.299	0.320	0.298	0.131
	เซลล์	0.681	0.701	0.692	0.130

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักและเซลล์ของ
ไอโซเลต BW13-1

ความเข้มข้น	ส่วนของสาร สกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง			
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Blank
0.9766	น้ำหมัก	0.685	0.783	0.824	0.107
	เซลล์	0.714	0.779	0.749	0.091
1.9531	น้ำหมัก	0.779	0.766	0.764	0.090
	เซลล์	0.770	0.785	0.760	0.117
3.9062	น้ำหมัก	0.742	0.769	0.765	0.106
	เซลล์	0.768	0.753	0.768	0.113
7.8125	น้ำหมัก	0.705	0.739	0.728	0.098
	เซลล์	0.776	0.770	0.755	0.124
15.625	น้ำหมัก	0.758	0.720	0.729	0.103
	เซลล์	0.782	0.757	0.764	0.107
31.25	น้ำหมัก	0.722	0.709	0.714	0.083
	เซลล์	0.761	0.725	0.741	0.100
62.5	น้ำหมัก	0.693	0.744	0.735	0.095
	เซลล์	0.759	0.749	0.739	0.151
125	น้ำหมัก	0.687	0.703	0.704	0.093
	เซลล์	0.720	0.721	0.724	0.101
250	น้ำหมัก	0.657	0.658	0.627	0.089
	เซลล์	0.696	0.702	0.680	0.111
500	น้ำหมัก	0.543	0.582	0.554	0.105
	เซลล์	0.647	0.666	0.644	0.109
1,000	น้ำหมัก	0.429	0.480	0.461	0.110
	เซลล์	0.568	0.579	0.590	0.131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้