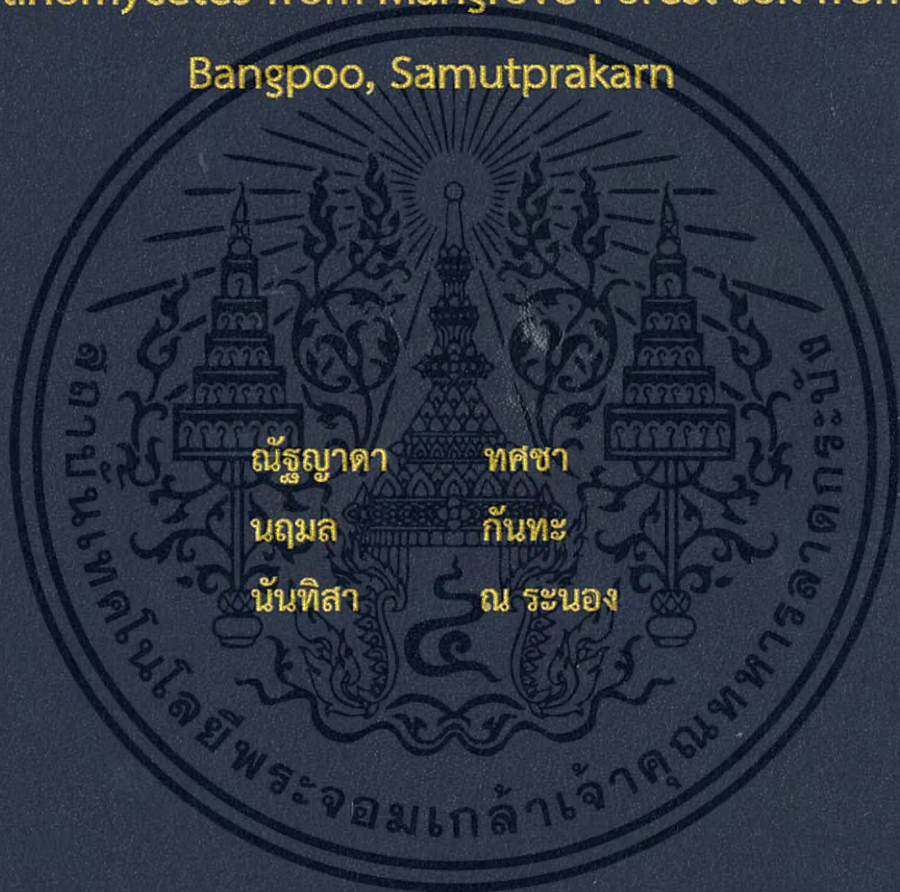


การศึกษาการเพาะเลี้ยงและฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน ต. บางปู จ. สมุทรปราการ

Phospholipids and cultivation characteristics of Actinomycetes from Mangrove Forest soil from Bangpoo, Samutprakarn



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาการเพาะเลี้ยงและฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน ต. บางปู จ. สมุทรปราการ

Phospholipids and cultivation characteristics of Actinomycetes from Mangrove Forest soil from Bangpoo, Samutprakarn



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phospholipids and cultivation characteristics of  
Actinomycetes from Mangrove Forest soil from  
Bangpoo, Samutprakarn



A SPECIAL PROJECT EDUCATIONSUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF  
SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY  
DEPARTMENT OF APPLIED BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาการเพาะเลี้ยงและฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชาย ต. บางปู จ. สมุทรปราการ  
Phospholipids and cultivation characteristics of Actinomycetes from Mangrove Forest soil from Bangpoo, Samutprakarn

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐญาดา ทศชา รหัสนักศึกษา 55051275  
นางสาวนฤมล กั้นทะ รหัสนักศึกษา 55051306  
นางสาวนันทิสา ณ ระนอง รหัสนักศึกษา 55051311

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชา ชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2558  
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไ้ ประธานกรรมการ	
ดร. วิมลมาศ บุญมี กรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาการเพาะเลี้ยงและฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอสโคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน ต. บางปู จ. สมุทรปราการ		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐญาดา	ทศชา	รหัสนักศึกษา 55051275
	นางสาวนฤมล	กัณฑ์	รหัสนักศึกษา 55051306
	นางสาวนันทิสา	ณ ระนอง	รหัสนักศึกษา 55051311
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์		

### บทคัดย่อ

เชื้อแอสโคติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากดินป่าชายเลนธรรมชาติ ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ จากนั้นทำการแบ่งกลุ่มของแอสโคติโนมัยซีทออกเป็น 10 กลุ่ม โดยแบ่งตามสีของ aerial mycelium เมื่อเทียบกับระบบสี NBS/ISCC จากนั้นจึงเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบความสามารถของการเจริญในอาหารที่สภาวะต่างๆโดยเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้ ในอาหาร Inorganic salts starch agar, ISP medium no.4 (ISP4) pH 8 มาทำการทดสอบหาความสามารถของการเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยใช้อาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนคือ Malt extract เปรียบเทียบกับ อาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) มีแหล่งคาร์บอนเป็น Soluble starch จากการสรุปได้ว่า แอสโคติโนมัยซีท ไอโซเลท FAJ 8 สามารถเจริญได้ในอาหาร ISP4 pH8 ได้ดีที่สุด และเมื่อนำมาทำการทดลองต่อชุดถัดไป พบว่า แอสโคติโนมัยซีท ไอโซเลท FAJ 8 สามารถเจริญได้ในอาหาร ISP4 ได้ดีกว่าอาหาร ISP2 และเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร ISP4 pH7 ที่บ่มเขย่าด้วยอุณหภูมิตั้งที่ 30 องศาเซลเซียส และในการทดลองสกัดฟอสโฟลิปิดจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน คืออาหาร ISP2 และ ISP4 พบว่า ไอโซเลท FAJ 8 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL)

**คำสำคัญ:** ดินป่าชายเลน, บางปู, ฟอสโฟลิปิด, สมุทรปราการ, แอสโคติโนมัยซีท,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Phospholipids and cultivation characteristics of Actinomycetes from Mangrove Forest soil from Bangpoo, Samutprakarn			
<b>Students</b>	Ms. Nutyada	Toscha	Student ID	55051275
	Ms. Naluemon	Kanta	Student ID	55051306
	Ms. Nanthisa	Na Ranong	Student ID	55051311
<b>Degree</b>	Bachelor of Science			
<b>Department</b>	Applied Biology			
<b>Academic Year</b>	2015			
<b>Advisor</b>	Dr. Khanungkan Klanbut			

### Abstract

29 isolate of Actinomycetes were isolated from mangrove forest soil in Bangpoo, Samutprakarn. And all isolates could be separate into 10 groups. By using the color of the erection mycelium. Compared with color NBS/ISCC system. Then the representative of each group were tested for their ability to thrive in the conditions isolates that can digest starch Inorganic salts starch agar, ISP medium no.4 (ISP4) pH 8. In addition to the test for the ability of the growth in the supply of carbon and nitrogen sources are different by using International Streptomyces Project (ISP2) supplemented with malt extract as a carbon source compared to Inorganic salts starch (ISP4) supplemented with soluble starch as a carbon source. Finally found that Actinomycetes isolates FAJ 8 is the best growing in ISP4 pH8. And when the next set of experiments that the actinomycetes isolates FAJ 8 in ISP4 were more likely grew better than ISP2 with the best growing in ISP4 pH7. Furthermore, the arrangement of phospholipid extraction from the culture of FAJ8 on ISP2 and ISP4, show the result of PLs on thin layer chromatography (TLC) by the major of PLs. In actinomycetes including Phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) spots which appeared in order compared with PLs standards.

**Keyword:** Actinomycetes, Bangpoo, mangrove forest soils, phospholipids, Samutprakarn

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยในครั้งนี้ผ่านไปได้ด้วยดี เพราะความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ทั้งด้านความรู้ คำแนะนำ การเดินทาง การยืมอุปกรณ์ในการทดลองต่างๆ งานวิจัยเล่มนี้จะไม่สำเร็จ ลุล่วงไปได้หากขาดความกรุณาและการช่วยเหลือจาก ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และสละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงการพิเศษนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณรศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ และ ดร. วิมลมาศ บุญมี ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดจนอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศึกษากุฬารัตนวลัยลักษณ์ ตึกวิทย์เก่า และตึกปฏิบัติการหลังใหม่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการเบิกอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งสถานที่ และเครื่องมือที่ใช้ในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่สำนักหอสมุดกลาง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการค้นคว้าหาข้อมูล รวมทั้งยืม-คืนหนังสือภายในหอสมุดกลาง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบิดา มารดา และสมาชิกภายในครอบครัว รวมถึงผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอนให้เป็นคนดี และสนับสนุนให้กำลังใจ และกำลังกายแก่คณะผู้ทำการวิจัย รวมทั้งขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

ณัฐญาดา ทศชา  
นฤมล กันทะ  
นันทิสา ณ ระนอง

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
2.1 ลักษณะของแอคติโนมัยซีท	5
2.2 การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย	5
2.2.1 Nocardioform Actinomycetes	5
2.2.2 Actinomycetes with multilocular sporangia	6
2.2.3 Actinoplanetes	6
2.2.4 Streptomycetes	6
2.2.5 Maduromycetes	6
2.2.6 Thermomonospora	6
2.2.7 Thermoactinomycetes	6
2.2.8 สกุลอื่นๆ	6
2.3 แอคติโนมัยซีทจีนัส <i>Streptomyces</i>	7
2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	7
2.5 การสร้างโคโลนี	8
2.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	9
2.6.1 ลักษณะของโคโลนี(configuration)	9
2.6.2 ขนาด (size)	9
2.6.3 การยกตัวของโคโลนี (elevation)	10
2.6.4 ขอบของโคโลนีจูลินทรีรี่ (margin)	10
2.7 โครงสร้างภายในเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีท	10
2.8 การกระตุ้นการเจริญเติบโต และการแตกปลาย hyphal	10
2.9 การสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว	11
2.9.2 การสร้างสปอร์เป็นสาย	11
2.9.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์	14
2.10 ระบบนิเวศป่าชายเลน	16
2.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16
2.11.1 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต	16
2.11.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic Nutrient Media)	18
2.11.3 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	19
2.12 นิเวศวิทยาของแอกติโนมัยซีท	21
2.13 การคัดแยกแอกติโนมัยซีท	21
2.14 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีท	22
2.15 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอกติโนมัยซีท	22
2.16 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin - layer chromatography หรือ TLC)	23
2.16.1 การเตรียมแผ่นTLC	27
2.16.2 การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC	27
2.16.3 Development ของแผ่น TLC (Development of TLC plate)	27
2.16.4 การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)	28
2.16.5 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC	28
2.16.6 ประโยชน์ของ TLC	28
2.17 Phospholipid	
2.18 ลักษณะดินป่าชายเลนจังหวัดสมุทรปราการ	30
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>31</b>
3.1 อุปกรณ์	31
3.2 เครื่องมือ	32
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	33
3.4 สารเคมี	34
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	35
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b>	<b>40</b>
4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินมัยซีท	41
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท	41
4.2.2 ชีวเคมีบางประการของเชื้อแอสคิตินมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท	71
4.3 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2), (Control) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีท	73
4.4 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอสคิตินมัยซีทด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)	103
4.5 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน	106
4.5.1 การหาน้ำหนักดิน	106
4.5.2 การหาปริมาณความชื้น	107
4.6.3 การวัดค่าความเป็นกรด-เบส	108
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>113</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย	113
5.2 ข้อเสนอแนะ	114
เอกสารอ้างอิง	115
ภาคผนวก	120
ภาคผนวก ก	121
ภาคผนวก ข	124
ภาคผนวก ค	125
ภาคผนวก ง	127
ภาคผนวก จ	128
ภาคผนวก ฉ	136
ภาคผนวก ช	159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอคติโนมัยซีท	29
4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้	40
4.2 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท	71
4.3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท จากการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8	74
4.4 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9	82
4.5 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9	83
4.6 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time : $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%	89
4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส	97
4.9 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส	98
4.10 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค thin layer chromatography และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8	105
4.11 แสดงปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง $10^{-1}$ หลักรอบ	106
4.12 แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินจากน้ำหนักของดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักดินคงที่	107
4.13 แสดงค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน	108
1(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 8	128
2(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ที่มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน	130
3(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน	131
4(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน	132
5(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน	133

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
6(จ) คำน้่านักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ใน การเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) ซึ่งเพาะเลี้ยงระดับอนุหภูมิที่แตกต่างกัน	134
7(จ) คำน้่านักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ใน การเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งเพาะเลี้ยง ระดับอนุหภูมิที่แตกต่างกัน	135
ฉ ตารางเทียบกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS/IBCC Color System)	136
ช แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีท	159



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	8
2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว	11
2.3 ลักษณะสปอร์เป็นสาย	12
2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	13
2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร	14
2.6 รูปทรงของอับสปอร์	15
2.7 การวางแผน TLC ที่แต้มสารแล้วลงในปีกเกอร์หรือขวดที่บรรจุตัวทำละลาย และการนำแผ่น TLC ที่ทำโครมาโตกราฟีเสร็จแล้วไปอังไอระเหยิดของไอโอดีน	25
2.8 ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำ TLC และการคำนวณ $R_f$	26
2.9 Development ของแผ่น TLC	27
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 3	42
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 5	43
4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 6	44
4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 7	45
4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8	46
4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 9	47
4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 11	48
4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 13	49
4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14	50
4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 15	51
4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 16	52
4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 31	53
4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 33	54
4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 34	55
4.15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 36	56
4.16 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 37	57
4.17 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 38	58
4.18 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 39	59
4.19 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 43	60
4.20 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 44	61
4.21 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 45	62
4.22 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 46	63
4.23 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 50	64
4.24 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 51	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.25 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 52	66
4.26 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 53	67
4.27 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 54	68
4.28 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 55	69
4.29 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 56	70
4.30 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) ของเชื้อแอสทีโนมัยซีท 10 ไอโซเลท การทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8	75
4.31 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า : $t_d$ (ชั่วโมง) ของเชื้อแอสทีโนมัยซีท 10 ไอโซเลท การทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8	76
4.32 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	77
4.33 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	77
4.34 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 43 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	78
4.35 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	78
4.36 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	79
4.37 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	79
4.38 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 31 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	80
4.39 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 36 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	80
4.40 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 50 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	81
4.41 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 52 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.42 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9	84
4.43 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า : $t_d$ (ชั่วโมง) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9	85
4.44 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 5	86
4.45 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 6	86
4.46 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 7	87
4.47 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 8	87
4.48 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 9	88
4.49 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%	91
4.50 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า : $t_d$ (ชั่วโมง) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.51 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 0%	93
4.52 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 0.5%	93
4.53 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 1%	94
4.54 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 2%	94
4.55 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 3%	95
4.56 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 4%	95
4.57 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 5%	96
4.58 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 6%	96
4.59 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate : $\mu$ ) ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 การทดลองที่ 4 โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส	99
4.60 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า : $t_d$ (ชั่วโมง) ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลท FAJ 8 การทดลองที่ 4 โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส	100

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.61 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะ เลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอา หารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	101
4.62 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะ เลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอา หารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	101
4.63 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะ เลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอา หารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	102
4.64 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะ เลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอา หารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	102
4.65 แสดงชนิดของ ฟอสโฟลิปิด บนแผ่นโครมาโตกราฟีโดยเทียบกับสาร Standard	104
4.66 แสดงฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ที่แยกโดย thin layer chromatography	111
4.67 แสดงการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดใน <i>S. coelicolor</i>	111

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

แอกติโนมัยซีทจัดอยู่ใน Order Actinomycetales เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและมีความสามารถในการสร้างเส้นใย (hyphae) สายยาว โดยส่วนใหญ่จะสร้างได้ทั้ง Substrate mycelium และ Aerial mycelium เส้นใยของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเส้นใยของรา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวง หรือ ขดเป็นเกลียว สายสปอร์อาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆจากเส้นใย หรือเกิดกันเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย และเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเบอ์เซ็นของ guanine และ cytosine (% G+C) สูงกว่าแบคทีเรียแกรม บวกทั่วไปประมาณ 55-78% โคโลนีจะมีลักษณะทึบแสง เรียบคล้ายหนังสัตว์ เป็นรอยย่น หรือ คล้าย กำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง ดำ เป็นต้น (ยวดี, 2546)

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

Phospholipids เป็น polar lipids เป็นองค์ประกอบที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะมีความสัมพันธ์กับเยื่อเลือกผ่านและรูปร่างของเซลล์ โดย phospholipids จะแสดงลักษณะเป็น amphipatic คือ มีทั้งบริเวณที่ชอบน้ำ และ บริเวณที่ไม่ชอบน้ำ ภายในโมเลกุล จากการวิเคราะห์ ส่วนประกอบของ phospholipids ที่พบในแอกติโนมัยซีท แบ่งออกเป็น 5 รูปแบบ คือ PI ไม่มี โครงสร้างที่เป็น nitrogenous, PII ประกอบด้วยโครงสร้างไนโตรเจนแบบ phosphatidylethanolamine เป็นหลัก, PIII โครงสร้างแบบphosphatidylcholine, PIV เป็น phospholipids ประเภท phosphatidylethanolamine และ glucosamine, PV เป็น phospholipids ประเภท glucosamine (Lechevalier *et al.*, 1981)

ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท จากดินป่าชายเลนธรรมชาติ ตำบล บางปู จังหวัด สมุทรปราการ โดยการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ นำเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่แยกได้มา ทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และศึกษาความสามารถของ การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 และ ISP4 โดยมี พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ NaCl ที่มีความแตกต่างกัน เพื่อหาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากการศึกษาทั้งหมดได้มุ่งเน้นถึงความ หลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีทเพื่อเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ และนำไปต่อยอดความรู้ได้ ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินธรรมชาติที่บริเวณป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ และกำหนดหมายเลขไอโซเลท

1.2.2 เพื่อศึกษาหาอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ

1.2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการใช้แบ่งของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

1.2.4 เพื่อศึกษาความแตกต่างของฟอสโพลิปิดที่สามารถแยกได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทในไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากแหล่งดินธรรมชาติที่บริเวณป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินธรรมชาติที่บริเวณป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ และทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท และกำหนดเป็นหมายเลขไอโซเลท หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการใช้แบ่งของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ จากนั้นนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาสกัดหาองค์ประกอบฟอสโพลิปิดที่ผนังเซลล์ของแต่ละไอโซเลท ด้วยเทคนิค Thin layer Chromatography (TLC)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินธรรมชาติที่บริเวณป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ

1.4.2 สามารถทราบอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ

1.4.3 สามารถทราบคุณสมบัติในการใช้แบ่งของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

1.4.4 สามารถสกัดฟอสโพลิปิดที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแต่ละไอโซเลทที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

## 1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน ต. บางปู จ. สมุทรปราการ

วิธีเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2013)

เลือกจุดการเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่ไม่มีขยะหรือเศษกิ่งไม้ โดยทำการขุดดินลึกลงไป 2-3 เซนติเมตร วัดความเป็นกรดต่างของดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินจากชายฝั่งจนถึงบริเวณน้ำทะเล เก็บตัวอย่างดินใส่ภาชนะเก็บตัวอย่าง และจดบันทึกความเป็นกรดต่างของดิน ลักษณะของดิน นำตัวอย่างดินที่เก็บมาแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วหรือภาชนะที่สะอาด ตากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่ร่ม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ตัวอย่างดินแห้ง

## 2. การเพาะเลี้ยงและการแยกเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีท (Klanbut, 2013)

ชั่งดินมา 1 กรัม แล้วนำไปใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer กำหนดระดับความเงาที่ 10-1 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเงาจนถึง 10-5 นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเงา 10-3 10-4 และ 10-5 ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate บนอาหารสูตร ISP2 ซึ่งเติม Nystatin 100  $\mu\text{L}$  ต่ออาหาร 100 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

## 3. การเตรียม spore suspension (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลท บนอาหาร ISP2 หรือ SFM agar หลังจากนั้นให้ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ทำการขูดเอาสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลงใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อ เพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจจะติดมากับสปอร์ออก และนำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงเทส่วนที่ใสทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด จากนั้นทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

## 4. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีท (Klanbut, 2013)

การตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพิจารณาจากการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการทำ Slide culture และตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีท โดยการศึกษาการตกตะกอนและการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม การย่อยสลายเจลาติน การย่อยสลายไนเตรตและการย่อยสลายแป้ง

## 5. การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญ (Balagurunathan et al, 2010)

ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีทแต่ละไอโซเลท โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง

## 6. การสกัดพอลิฟอสเฟต (Klanbut, 2013)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมซีทโดยการถ่ายเชื้อด้วยลูปถ่ายเชื้อหรือใช้ 50 ไมโครลิตร ของสารละลายสปอร์ ลงในอาหารเหลว Yeast extract Malt extract (YEME) 100 mL ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 mL บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนของเซลล์ไว้ และเทส่วนที่ใสทิ้ง หลังจากนั้นชั่งตะกอนเซลล์ 100 มิลลิกรัมของมวลเปียก ซึ่งคาดว่าเท่ากับน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งของเส้นใย ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube อันใหม่ เติมสารละลายของ Chloroform 100 ไมโครลิตร methanol 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 80 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็น

เวลา 10 นาที ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Chloroform 100 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน 2-3 นาที เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 100 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างแล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เพื่อแยกชั้นโดยน้ำลอยอยู่ข้างบนและชั้นกลางคือสารละลายของสารอินทรีย์ ชั้นล่างคือตะกอนเซลล์ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอินทรีย์ชั้นกลางใส่หลอดใหม่ แล้วนำไป evaporated ให้แห้งใน vacuum centrifuge หลังจากนั้นทำการ resuspended ใน 3 ไมโครลิตร chloroform ก่อนนำไปหยดตัวอย่างลงบน Kiesel Gel 60 F254 plates 20x20 cm แล้ววางลงใน tank ที่ประกอบด้วยสารละลายตัวพาที่ประกอบด้วย chloroform/methanol/acetic acid/น้ำ (80:12:15:4 [vol/vol/vol/vol]) โดยใน tank บุด้วย chromatography paper (กระดาษ whatman) และทิ้งให้ไอรระเหยเต็ม tank เป็นเวลา 30 นาที จึงวาง TLC plate ลงไปปล่อยให้สารละลายตัวพาวิ่งขึ้นไปประมาณ 4 ใน 5 ของ TLC plate จึงนำออกมาแล้วสเปรย์ด้วยสารละลาย ammonium molybdate จากนั้นเปรียบเทียบจุด (spot) ที่ได้เทียบกับ phospholipids standard ความเข้มข้น 5 mg/mL ได้แก่ L- $\alpha$ -Phosphatidy-DL-glycerol sodium salt จาก egg yolk lecithin (PG); 3-sn Phosphatidylethanolamine จาก bovine brain (PE) และ Cardiolipin sodium salt จาก bovine heart (CL) (Sigma-Aldrich Chemie) คำนวณค่า Retention factor (RF)

## 7. การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

### 7.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10-1 ที่เหลืออยู่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยออกจนหมด และมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบและหลังอบ

### 7.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดิน 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิค บีกเกอร์ หรือภาชนะที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างดิน จากน้ำหนักดินที่หายไป

### 7.3 การวัดค่าความเป็นกรด เบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยๆ โดยในขณะนั้น ให้ทำการคนตัวอย่างของดินไปด้วย ด้วยช้อนคนสารหรือแท่งแก้วคนสาร จนสังเกตเห็นเป็นแผ่นฟิล์มบางๆเกิดขึ้นที่บริเวณผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที -1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่ากรด-เบส ทำแบบเดิมซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและเป็นแอโรบิกแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียเส้นสาย หรือเรียกว่า hyphae สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้สปอร์ สารพันธุกรรม DNA มีเบส G+C อยู่ระหว่าง 57-75% แอกติโนมัยซีท มาจากคำว่า “aktis” ในภาษากรีก แปลว่า ray และ “mykes” แปลว่า fungus คำแรกแสดงถึงกลิ่นของดิน ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่ของแอกติโนมัยซีท ในสเตรปโตมัยซีท สารที่รู้จักกันในชื่อ ‘Geosmin’ ทำให้เกิดกลิ่นของดิน การผลิตสารมากมายที่ได้จาก สเตรปโตมัยซีท ยังทำให้เกิดลักษณะของกลิ่นอีกด้วย (Bais *et al.*, 2012)

แอกติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา คือ มีการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ แต่ขนาดเซลล์เล็กเท่ากับแบคทีเรีย มักยึดเกาะแน่นในโคโลนีที่จมอยู่ในอาหารที่เจริญอยู่ ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศแห้งจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสปอร์ ซึ่งใช้ในการแพร่พันธุ์ เช่นเดียวกับกับเชื้อ ดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก น้ำ โคลนตม และบริเวณรากพืช (Goodfellow *et al.*, 2012)

แอกติโนมัยซีท สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในดิน ปริมาณของแบคทีเรียแอกติโนมัยซีทที่พบในดินขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของดิน เช่น ในดินทั่วไป 1 กรัม ที่มีสภาพความเป็นกรดและมีปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน จะพบแอกติโนมัยซีท ประมาณ 105- 108 เซลล์ แต่ถ้าเป็นดินที่มีสภาพแห้งและมีสภาพเป็นด่างจะพบแอกติโนมัยซีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยอาจพบได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในดินนั้น และแอกติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีท (Streptomyces) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและความหนาแน่นมากที่สุด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีส่วนช่วยในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในสิ่งแวดล้อม (Goodfellow and Simpson, 1987)

### 2.2 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท

โดยทั่วไปข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกแอกติโนมัยซีท คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะ ของสายใยอากาศ สายใยอาหาร (Conidia) และอับสปอร์ ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยซีทได้

นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท คือ ลักษณะรูปร่างและ สีของสายใยสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่สู่อาหาร (diffusile pigment) การสร้างรงควัตถุเมลานิน และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16 rRNA ตามรายละเอียดข้างต้นสามารถใช้ในการ จำแนกแอกติโนมัยซีทได้เป็น 8 กลุ่มใหญ่ดังนี้

#### 2.2.1 Nocardioform Actinomycetes

กลุ่มนี้มีลักษณะแตกต่างกันส่วนมากมีการแตกหักของเส้นใยบางกลุ่มมีการสร้างสายใยอากาศอาจมี หรือไม่มี Mycolic acid สามารถแบ่ง กลุ่มย่อยได้ดังนี้

##### 2.2.1.1 แอกติโนมัยซีทที่พบ Mycolic acid

##### 2.2.1.2 Pseudonocardia และสกุลใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1.3 Nocardiosis และ Terrabacter

### 2.2.1.4 Promicronospora และสกุลใกล้เคียง

## 2.2.2 Actinomycetes with multilocular sporangina

กลุ่มนี้เส้นใยมีการสร้างผนังกันแบ่งตามยาวและตามขวางมีการสร้างสปอร์ขนาดใหญ่สปอร์อาจ เคลื่อนที่ได้ เช่นสกุล Dermatophilus และ Geodermatophilus เป็นต้น หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น สกุล Frankia

## 2.2.3 Actinoplanetes

มีการสร้างเส้นใยที่แข็งแรงไม่พบการสร้างสายใยอากาศหรือมีการสร้างน้อยสปอร์เคลื่อนที่ได้เกิดใน อับสปอร์ (Actinoplanes, Ampullariella, Dactylosporngium และ Pilimelia) หรือสปอร์สร้างเดี่ยวที่ไม่ เคลื่อนที่ได้แก่ Micromonospora หรือสปอร์ต่อกันเป็นสาย ได้แก่ Catellatospora ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และไกลซีน ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบอะราบิโนส และ ไซโลส

## 2.2.4 Streptomycetes

และสกุลที่ใกล้เคียง ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-DAP และไกลซีน มีการสร้างสายใยสปอร์สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ Streptomyces และ Streptoverticillium ในสกุลอื่นคือ Kineosporia และ Sporichthya มีการสร้างสายใย อากาศน้อยหรือไม่สร้างและมีการสร้างสปอร์ในลักษณะที่แตกต่างกันไป

## 2.2.5 Maduromycetes

สร้างสปอร์สายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ มีการสร้างสปอร์ 2 สปอร์พบในสกุล Microbispora การสร้างสปอร์สี่ สปอร์ พบในสกุล Microtetraspora และใน Actinomadura มีการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ในบางสกุลมี การสร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ Planbispora, Planomospora และ Spirillora หรือ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ Streptosporangium ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ในเซลล์ที่ถูกย่อย พบ Madurose

## 2.2.6 Thermomonospora

และสกุลใกล้เคียง สร้างสปอร์บนสายใยอากาศอาจเป็นสปอร์เดี่ยวได้แก่ Thermomonospora สปอร์ต่อกันเป็นสายพบ ใน Atinosynnema และ Nocardiosis หรือสร้างสปอร์ในโครงสร้างที่คล้ายกับอับสปอร์คือ Streptoalloteichus ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP

## 2.2.7 Thermoactinomycetes

ประกอบด้วยสกุล Thermoactinomyces เพียงสกุลเดียว สร้างสปอร์เดี่ยวซึ่งเป็น Endospore มีการ สร้างทั้งสายใยอากาศ และสายใยอาหารทุกสปีชีส์เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ผนังเซลล์ ประกอบด้วย meso-DAP

## 2.2.8 สกุลอื่นๆ

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดเข้าในกลุ่มอื่นได้ ประกอบด้วยสกุล Kitasatoporia, Glycomyces, Kibdelosporangium และ Sacchaothrix ทุกสกุลมีการสร้างสายสปอร์บนสายใยอากาศ (ยวดี, 2546)

## 2.3 แอคติโนมัยซีทจีนัส *Streptomyces*

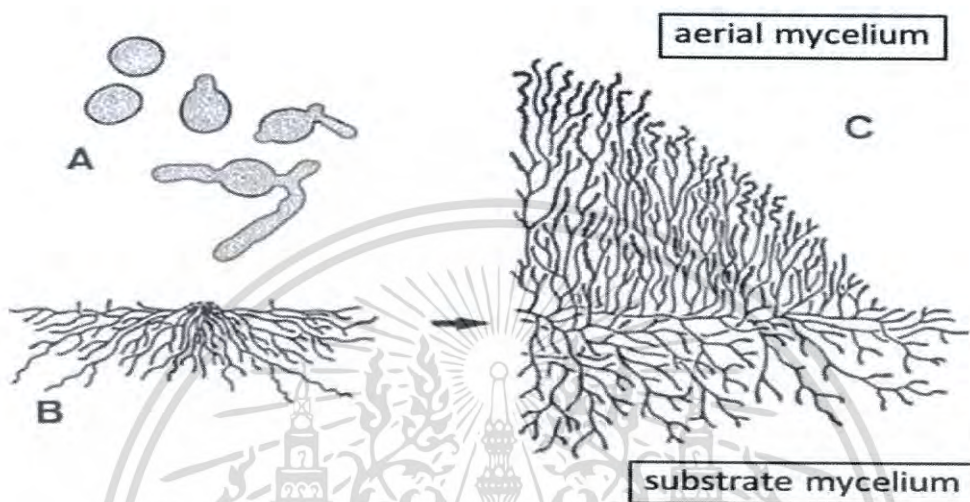
เป็นแอคติโนมัยซีทจีนัสที่สามารถพบได้มากที่สุด มีการเจริญของส่วนปลาย และแตกแขนงได้มาก และในบางสายพันธุ์ก็ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (รัตนาภรณ์, 2548) *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ มีความสำคัญในด้านยาปฏิชีวนะ มีการเจริญเติบโตโดยการขยายปลาย hyphal ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ส่วนปลายจาก de novo cell wall มากกว่าการแทรกของ murein ใหม่เข้าสู่ผนังด้านข้าง (Dyson, 2014) การเจริญของส่วนปลายนี้เกิดจากการขยายหลายๆผนังเซลล์โดยกลไกภายใน และภายนอก (Elisa *et al.*, 1992) *Streptomyces* เจริญเติบโตโดยการสร้างขั้วขึ้นที่ผนังเซลล์ โดยมีการกำหนดเป้าหมายของ DivIVA ไปยังปลาย hyphal (Flärdh, 2010) ในอีกมุมมองหนึ่งการโยกย้าย nucleoid ในระหว่างการสร้างสปอร์ รูปแบบของการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์จะถูกจัดระบบใหม่ (Flärdh, 2003)

## 2.4 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม ท่อน หรือเป็นเส้นสาย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคลายเชื้อรา คือมี mycelium แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากราที่สำคัญของแอคติโนมัยซีทคือ ไม่มี เยื่อหุ้มนิวเคลียส ซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต และขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา ซึ่งมี เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นตรงที่พบว่าโคโลนีเกาะแน่น และมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบ ขรุขระคล้ายหนังสัตว์ หรือ เป็นผงคล้ายกำมะหยี่ และไม่มีลักษณะมีนวล บางชนิดอาจมี การสร้างรังควัตถุสีต่างๆ เช่น สีส้ม สีครีม สีเทา เป็นต้น นอกจากนั้นค่า G+C content จะมีค่ามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น (รัตนาภรณ์, 2548) ส่วนการเจริญของเส้นใยสามารถเจริญไปเป็น เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรียมาก แอคติโนมัยซีทเจริญได้อย่างช้า ๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอคติโนมัย (Martin, 1961)

## 2.5 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียที่เกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง (รูปที่ 2.1) เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยวหรือสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (Atlas of Actinomycetes, 1997)

- A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย
- B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปใ้อาหาร (substrate mycelium)
- C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

ลักษณะของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยแบบ aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยแบบ aerial mycelium ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัดทำให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียฟูหรือเรียบแบนบางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่ม, เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ, นูน, ขรุขระหรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี มีความแตกต่างตั้งแต่ หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Atlas of Actinomycetes, 1997)

## 2.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีต

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตเป็นแบบ complex colony เนื่องจากมีการสร้าง arthrospores โดยแอสโคไมซีตพวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้จะถูกจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และสกุล *triosporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya* และ *Streptovercillium* การรวมตัวของเส้นใยที่แอสโคไมซีตสร้างขึ้นทำให้เกิดเป็นโคโลนี การเกิดโคโลนีใหม่อาจเกิดจากเพียงแค่ 1 สปอร์หรือ 1 ท่อนของเส้นใยก็สามารถเจริญเป็นโคโลนีใหม่ได้ (รัตนภรณ์, 2548) ยกตัวอย่างเช่นการสร้างโคโลนีของ *Streptomyces carpinesis* เริ่มจาก 2 วันแรกในการบ่ม เชื้อแอสโคไมซีตจะมีการสร้าง hyphae ขึ้นทั้งบริเวณพื้นผิวแล้วในชั้นอาหาร เมื่อครบ 3 วันเส้นใยต่างๆจะเริ่มมีการแตกกิ่งก้านสาขามากขึ้น โดยที่บริเวณบนสุดของโคโลนี substrate mycelium จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น aerial mycelium ส่วน substrate mycelium ที่อยู่ใต้ผิวอาหารจะเจริญลึกลงไป เมื่อห้าวันผ่านไป จะเริ่มมีการสร้าง spore chains ทั้งที่บริเวณ substrate mycelium และ aerial mycelium (Miguélez et al., 1997)

โคโลนีของแอสโคไมซีต เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย การเกิดโคโลนีใหม่อาจเริ่มจากการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งอาจจะเพียง 1 สปอร์ หรือ 1 อับสปอร์ หรือ 1 ท่อนของเส้นใยของชิ้นส่วนเล็กๆของโคโลนีเก่าๆ หรือจากเชื้อที่เก็บอยู่ในอาหารวันเอียงบนอาหารแข็ง หรือเชื้อจะเริ่มเจริญเป็นเส้นใยแทรกลงไป ในอาหารวันเอียงบนอาหารแข็ง ก่อนเชื้อจะเริ่มเจริญเป็นเส้นใยแทรกลงไป ในอาหารวัน (เส้นใยใต้ผิวอาหาร) ซึ่งจะเรียกว่า primary หรือ vegetative mycelium หลังจากนั้นจึงมีการเจริญของเส้นใยในแนวตั้งขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และกลายเป็น secondary mycelium เส้นใยที่อยู่เหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) จะเป็นส่วนที่สัมผัสอากาศ ความแตกต่างระหว่างธรรมชาติที่ชอบน้ำของเส้นใยใต้ผิวอาหารและธรรมชาติที่ไม่ชอบน้ำของเส้นใยของผิวอาหารนี้ยังเป็นที่น่าสนใจมาก และสามารถสังเกตได้ง่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

โคโลนีของแอสโคไมซีต ประกอบด้วยรูปร่างแบบยกสูงชัน (raise) หรือ แบนๆ (flat) ลักษณะโคโลนีอาจคล้ายกับหนังสัตว์ และโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มมากๆจนถึงแข็งมากๆ มีหลากหลายสีเช่น สีขาว สีเหลือง สีส้ม สีกุหลาบ สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน สีน้ำตาล เป็นต้น ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) เป็นสันนูน (ridged) เหี่ยวย่น (wrinkled) เป็นเม็ดๆ (granular) หรืออาจพบเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัส (squamous) บางโคโลนีอาจอัดกันแน่น หรืออาจมีหลายๆโซนของการเจริญในลักษณะของโคโลนีที่เป็นวงๆ หรือกระจายออกจากจุดศูนย์กลางในลักษณะรัศมี ส่วนขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับอายุและภาวะของการเจริญและอาจมีขนาดแตกต่างกันได้ตั้งแต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรจนถึงขนาดหลายเซนติเมตร (รัตนภรณ์, 2548)

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีแอสโคไมซีต

### 2.6.1 ลักษณะของโคโลนี(configuration)

รูปร่างของโคโลนีบนจานอาหารอาจมีรูปร่างกลม (round) รูปร่างไม่แน่นอนและเจริญลามไปบนจานอาหาร (irregular and spreading)หรือเจริญเป็นเส้นคล้าย รากไม้ (rhizoid) เป็นต้น

### 2.6.2 ขนาด (size)

โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็มหมุดจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร

### 2.6.3 การยกตัวของโคโลนี (elevation)

งานพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหารอาจแบนราบหรือนูน จึงทำให้โคโลนีที่ยกตัวมีหลายแบบ

### 2.6.4 ขอบของโคโลนีจูลินทรีย์ (margin)

มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ (Miguélez *et al.*, 1997)

## 2.7 โครงสร้างภายในเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท

เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกันและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ไนไซโตพลาสซึม ประกอบไปด้วยสาย ดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดมีไซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (Atlas of Actinomycetes, 1997)

## 2.8 การกระตุ้นการเจริญเติบโต และการแตกปลาย hyphal

การเจริญเติบโตของแอกติโนมัยซีทจะคล้ายกับเชื้อราคือ เจริญทางปลายสุดของ hypha เป็นแบบ apical growth และมีอัตราการเจริญ (growth rate) ช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไป และเชื้อราประมาณ 7-14 วัน (สายสมร, 2547)

การเจริญเติบโตของส่วนปลายเป็นความสามารถในการเจริญเติบโตแบบการแตกแขนงของเซลล์ที่เฉพาะเจาะจง เป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตที่มีผนังเซลล์ การเจริญเติบโตของขั้วแสดงออกโดย planctomycetes อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของส่วนปลายเป็นส่วนที่ดีที่สุดในส่วนอื่นๆของ Gram-positive phylum actinobacteria ของจำพวก *Corynebacterium* และ *Mycobacterium* การเจริญเติบโตเป็นเซลล์รูปแท่ง (ยกเว้น pleomorphic) และแสดงการเจริญเติบโตเด่นชัดที่ขั้ว บนผนังเซลล์ ในขณะที่ยังคงรูปทรงกระบอก และขั้วที่นิยมในการเจริญเติบโตที่พบใน filamentous actinobacteria ใน streptomycete เริ่มต้นชีวิตเป็นสปอร์จากหนึ่งหรือมากกว่า โดยแตกหน่อ เส้นใยเหล่านี้เติบโตโดยการขยายปลายที่มีสาขาใหม่ที่ปรากฏในตำแหน่งอยู่หลังปลาย การเติบโตของแขนงใหม่นี้เกิดขึ้นโดยการขยายส่วนปลาย เมื่อสาขาใหม่ปรากฏขึ้นเกิดจากการควบคุมของขั้วเซลล์

แบคทีเรียส่วนใหญ่จะห่อหุ้มอยู่ในผนังเซลล์ peptidoglycan sacculus ซึ่งเป็นโมเลกุลเครือข่ายที่ยังคงความสมบูรณ์ของเซลล์ รูปร่างและการเจริญเติบโตของ sacculus นี้จะถูกกำหนดโดยการแปลและการประสานงานของ synthases peptidoglycan, hydrolases และโปรตีนอื่น ๆ ที่รวบรวมไว้ในผนังเซลล์ใหม่ โปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่เป็นคอมเพล็กซ์ multiprotein และจะถูกนำไปยังตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงในเซลล์โดยมี cytoskeletal เป็นองค์ประกอบ เช่น

*Escherichia coli* และเชื้อ *Bacillus subtilis* การเจริญเติบโตของผนังเซลล์เป็นสมมาตรและเกิดขึ้นโดยการใส่เส้นใยใหม่ของ peptidoglycan เข้าไปในผนังเซลล์รูปทรงกระบอกด้านข้าง ซึ่งการยึดตัวของเซลล์ intercalatory จะดำเนินการโดยเอนไซม์ที่ซับซ้อนเรียกว่า elongase ที่สันนิษฐานว่ากำกับโครงสร้างของเซลล์ MreB โครงสร้างของเซลล์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องชัดเจนมากขึ้นเมื่อส่วนอื่นของ Rhizobiales และ actinobacteria ที่ขั้วมีการเจริญเติบโต และไม่ได้ใช้ MreB ในการกำกับ การเจริญเติบโตของผนังเซลล์และ morphogenesis ใน Rhizobiales ก็ยังไม่ทราบว่า การเจริญเติบโต

ของขั้วจะประสบความสำเร็จ แต่ใน actinobacteria การเจริญเติบโตของขั้วกำกับโดยโปรตีน cytoskeletal เหมือน DivIVA (Flärdh, 2012)

## 2.9 การสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การสร้างสปอร์ แอคติโนมัยซีทที่เรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

### 2.9.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว

การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน Micromonospora ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกันและสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล Thermomonospora สร้างสปอร์เดี่ยว บนสายใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้าง เป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ Saccharomonospora มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ Micromonospora, Thermomonospora และ Saccharomonospora ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิด จากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ Micromonospora, Thermomonospora และ Saccharomonospora (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว (Atlas of Actinomycetes, 1997)

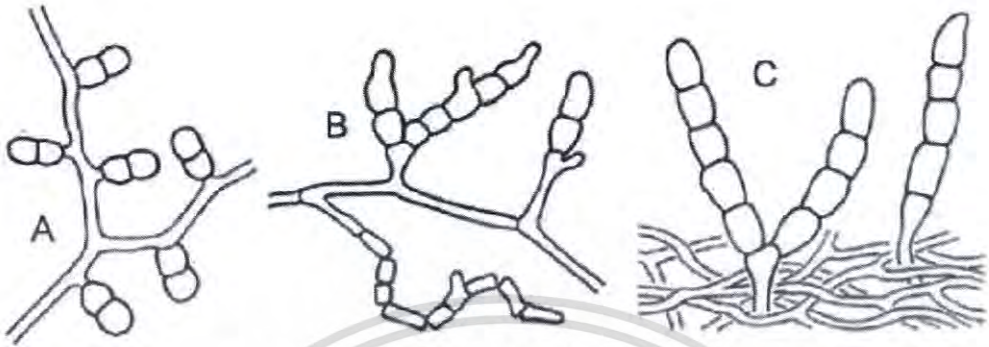
- A: Micromonospora
- B: Thermomonospora
- C: Saccharomonospora

### 2.9.2 การสร้างสปอร์เป็นสาย

ในแอคติโนมัยซีทที่เรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วน ใหญ่สามารถ แบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือ จำนวนของสปอร์นั้นคือ di หรือ bisporous, oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล Microbispora เป็นการสร้าง สปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใย อากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (รูปที่ 2.3) นอกจากนี้สกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Actinobispora มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง



รูปที่ 2.3 ลักษณะสปอร์เป็นสาย (Atlas of Actinomycetes, 1997)

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

B: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena*

C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Catellatospora*

แอกติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒนาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์ (รูปที่ 2.3) บนสายใยอาหารในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ *N. brevicatena* และ *S. rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปีชีส์ในสกุล *Actinomadura*

และ *Microtetraspora* สร้างสปอร์สายสั้นๆบนสายใยอากาศจำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ และจนถึง 10 -20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อน 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptovorticillium* มีลักษณะเฉพาะคือ ก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์เป็นเกลียว ซ้อนติดกันกับเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะเกิด การบิดสายสปอร์สั้น อาจจะตรงโค้งงอกลายเป็นขอ การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora*, *Microcelospora* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้นหรือสายสั้นๆ บนสายใย อาหาร สายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์ กลม *Catellatopora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนโค้งงอ มีสปอร์ 5 - 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหาร เป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง แอกติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญ สปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการ สร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ (ภาพที่ 4) สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนแบคทีเรียชนิด อื่นๆที่มี สปอร์มากกว่ามักเรียกว่า *Arthospores* ซึ่งสอดคล้องกับ *Arthospores* ของกลุ่มรา ในกลุ่ม *Deuteromycota* ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสาย สปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2.1 Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ

2.9.2.2 Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) จะเป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น

2.9.2.3 Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็น เกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น

2.9.2.4 Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงกันแน่น ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาท ทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ Pseudoncardiaceae เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ Nocardiosis ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง, งอ หรือ ซิกแซก



รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* (Vobis, 1977)

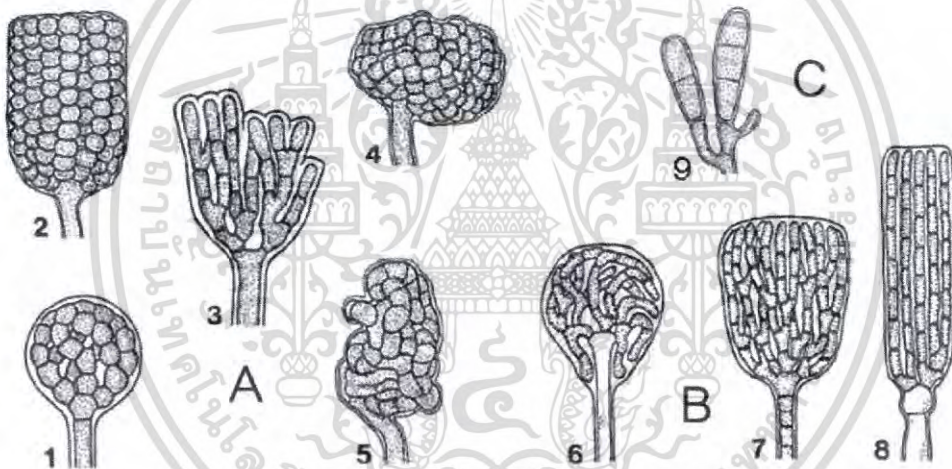
- 1: Rectiflexbiles
- 2: Retinaculiaperti
- 3: Spira
- 4: Verticillati

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.9.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

2.9.3.1 กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล Actinoplanes อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงซดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนัง ท่อหุ้ม (รูปที่ 2.5) สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Actinoplanes* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูป ทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์ เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูป ทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถว ขนานกันหรือววนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวน สปอร์แบบ *Oliosporous* คือมีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ



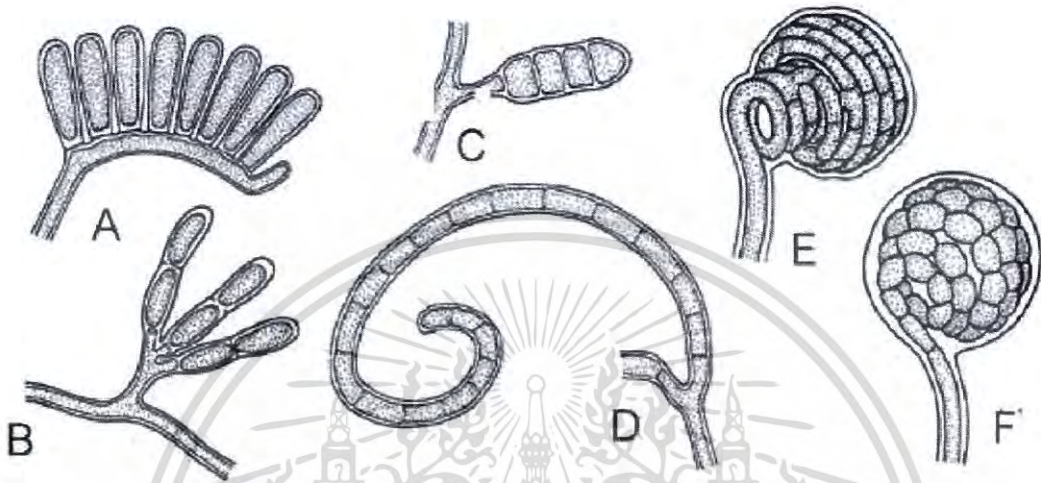
รูปที่ 2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร (Atlas of Actinomycetes, 1997)

- A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*)
- B: สกุล *Pilimelia*
- C: สกุล *Dactylosporangium*

2.9.3.2 กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ (รูปที่ 2.6) ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบน ยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ สกุล *Spirllspora* มีอับสปอร์เรียง ตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่ง และโค้งงอ



รูปที่ 2.6 รูปทรงของอับสปอร์ (Vobis, 1977)

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

เนื่องจากแอกติโนมัยซีทสามารถสร้างเส้นใยได้ โดยพบว่ามี การสร้างเส้นใย 2 ชนิดคือ substrate mycelium ใช้ในการยึดเกาะกับอาหารและดูดอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต และ aerial mycelium ใช้ในการสืบพันธุ์จากการศึกษาพบว่าเส้นใยที่แก่จะมีการสร้างผนังกัน (septate) เพื่อแบ่งเซลล์โดยที่แต่ละเซลล์จะมีขนาดประมาณ 20 ไมครอน และอาจมี nucleoid หลายชุดภายใน 1 เซลล์ จากนั้นจึงหักหลุดเป็นท่อนๆ มีรูปร่างหลายแบบเช่น pleomorphic, club shape cell เป็นต้น กลายเป็น spore ซึ่งส่วนมากจะเป็น asexual spore สปอร์ส่วนใหญ่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile spore) แต่ก็มีบางชนิดที่เป็นส่วนน้อย ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (flagellate spore) จากการศึกษาพบว่าจะมีการสร้าง substrate mycelium ก่อน แล้วจึงมีการสร้าง aerial mycelium เพื่อการสืบพันธุ์หรือภายใต้สภาวะความเครียด เช่น สร้างเมื่อขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound และจะมี hydrophobic sheath หุ้มเส้นใยอยู่ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยของแอกติโนมัยซีทมีหลายสีขึ้นอยู่กับชนิด (species) ของแอกติโนมัยซีท เช่น ขาว ใส ไม่มีสี เหลืองอ่อน น้ำตาลอ่อน แดงชมพู ส้ม เขียว หรือดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสี (pigment) ที่สร้างมีทั้งที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ หากละลายน้ำได้ จะปรากฏสีบนอาหาร แต่หากละลายน้ำไม่ได้จะไม่ปรากฏสีบนอาหารเลย (สายสมร, 2547) (Atlas of Actinomycetes, 1997)

## 2.10 ระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นสิ่งมีชีวิตที่ขึ้นอยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่มีระดับน้ำทะเลท่วมถึงในช่ วงที่น้ำทะเลขึ้นสูงสุด หรือหมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยพรรณไม้หลายชนิด หลายตระกูล และเป็นพวกที่มีใบเขียวตลอดปี (evergreen species) ซึ่งมีลักษณะทางสรีระวิทยาและความต้องการสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกัน ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยพรรณไม้ สกุลโกงกาง (Rhizophora) เป็นไม้สำคัญและมีไม้ตระกูลอื่นปะปนอยู่บ้าง (สนิท, 2542)

ป่าชายเลนประกอบด้วยพืชไม้ที่มีความเป็นเอกลักษณ์ ตั้งอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลเขตร้อน เป็นระบบนิเวศที่มีผู้ผลิตจำนวนมาก แต่น่าแปลกใจเล็กน้อยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ โดยพบหลักฐานที่แสดงถึงป่าชายเลนว่าเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์จำนวนมากและ เป็นแหล่งที่ค้นพบ แอคติโนมัย-ซีท ชนิดใหม่ๆ นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชไม้ป่าชายเลน ฟังไจแบคทีเรีย รวมไปถึงแอคติโนมัยซีทอีกด้วย (Hong *et al.*, 2009)

สิ่งแวดล้อมของป่าชายเลนมีความแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆอย่างมาก ลักษณะการกระจายตัวและลักษณะทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนคาดว่าจะมีความแตกต่างจากแอคติโนมัย-ซีท ที่ได้จากดินทั่วไป (Thawai *et al.*, 2008)

ระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความซับซ้อน มีหน้าที่เป็นปราการเชื่อมต่อระหว่างระบบนิเวศบนบกและนิเวศทางทะเล โดยทำหน้าที่ช่วยเก็บกักตะกอนและกั้นกรองความสกปรกที่มาจากกิจกรรมบนบก และยังมีหน้าที่ช่วยรักษามวลดินและหน้าดินไม่ให้ถูกพัดพาออกจากขอบฝั่งและริมตลิ่ง นอกจากนี้ ระบบนิเวศป่าชายเลนยังเป็นแหล่งผลิตออกซิเจน และเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตสูง เหมาะแก่การท่องเที่ยวและศึกษาวิจัย

ระบบนิเวศป่าชายเลนป่าชายเลนในประเทศไทยมีสถานภาพแตกต่างกัน ทั้งในด้านพืชพรรณ ลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ ลักษณะทางสังคมเศรษฐกิจ และวัฒนธรรมของชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียง จึงเป็นสาเหตุให้ระบบนิเวศป่าชายเลนในแต่ละพื้นที่มีสภาพปัญหาแตกต่างกัน (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2559)

## 2.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาเรื่องแบคทีเรียมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น โดยมีการควบคุมสภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เป็นไปตามธรรมชาติของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้มากที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเรียนรู้ความต้องการต่าง ๆ ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ และนำมาศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

### 2.11.1 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

#### 2.11.1.1 พลังงาน ( Energy )

##### 2.11.1.1.1 แหล่งพลังงานจากแสง แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงเรียกว่า

Phototroph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1.1.2 แหล่งพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชัน ( Oxidation ) ของสารเคมี  
แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันเรียก Chemotroph

#### 2.11.1.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources)

แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ แบคทีเรียที่ต้องการ  
สารอาหารในรูปของสารอนินทรีย์ สามารถเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกว่า  
Autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ด้วยเรียกว่า Photoautotroph ถ้าได้พลังงานจากการ  
ออกซิเดชันของสารเคมีด้วยเรียก Chemoautotroph ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของ  
สารอินทรีย์ เรียก Heterotroph

#### 2.11.1.3. แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources)

แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม พวกที่ใช้สารอนินทรีย์เป็น  
แหล่งอิเล็กตรอนเรียก Lithotroph ส่วนพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเรียก  
Organotroph

#### 2.11.1.4 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

แหล่งของไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน  
เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แก๊สไนโตรเจนในอากาศ หรือแอมโมเนียม

#### 2.11.1.5 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส

ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำ และสารอาหาร แหล่งของซัลเฟอร์ อาจอยู่ในรูปของ  
สารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดแหล่งของ  
ฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของ ฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด  
กรดไทโคอิก และสารอื่น ๆ

#### 2.11.1.6 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย เช่น  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  
 $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  เป็นต้น ซึ่งบางชนิดจัดเป็น Co factor ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ

#### 2.11.1.7 วิตามิน

แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรง  
ชีวิตและการเจริญเติบโตมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ แบคทีเรียบางชนิด  
สามารถสังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียชนิดก่อโรคเป็นพวก heterotrophic microorganism ซึ่งมีความสามารถในการ  
สังเคราะห์อาหารจำกัดจึงต้องการอาหารซึ่งซับซ้อนขึ้น เช่น complex nitrogen compound ดังนั้น  
จึงมักใช้อาหารซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนในธรรมชาติ (crude natural protein source) แต่ว่า  
แบคทีเรียไม่สามารถใช้โปรตีนนี้ได้โดยตรงแต่ต้องทำให้อยู่ในรูปซึ่งสามารถนำไปใช้ได้เสียก่อน โดย  
การย่อยโปรตีนเหล่านี้ด้วยกรด ด่าง หรือ เอนไซม์ต่างๆ โปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วนี้ (protein  
hydrolysates) โดยส่วนใหญ่เรียกว่า peptones ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ง่ายและประกอบด้วย  
Polypeptidase ตลอดจน amino acids ในปริมาณต่างๆ กันซึ่งสารเหล่านี้แบคทีเรียสามารถ  
นำไปใช้ได้ทันที แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณ Polypeptidase และ amino acids ใน peptones แต่ละ  
ชนิดและจากแต่ละบริษัทจะไม่เหมือนกัน ความต้องการอาหารชนิดต่างๆ ของพวก heterotrophic  
bacteria จะแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงต้องมี peptones หลายชนิดเพื่อใช้งานต่าง ๆ กัน และมีสูตร  
ของอาหารเลี้ยงเชื้อมากมาย ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (dehydrated media) มากมายหลายชนิดซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานพอสมควรอีกทั้งยังสะดวกในการเตรียมอีกด้วย

### 2.11.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

2.11.2.1. Peptones : ตั้งได้กล่าวในตอนต้นแล้ว Peptone คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้ว เป็น Amino acid และ Simple Nitrogenous compounds อาจโดยใช้กรด ต่าง หรือ เอ็นไซม์ คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน ( ด้วยกรด ต่าง หรือ เอ็นไซม์ ) การย่อยด้วยกรดหรือต่าง จะทำลายวิตามินและ Amino acids บางส่วนในโปรตีนไป ซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์ โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิต Peptones มีหลายชนิด เช่น Casein ( โปรตีนในน้ำนม ) Gelatin เนื้อ ถั่วเหลือง และ Yeast cells เป็นต้น Peptones เป็นส่วนประกอบหลักใหญ่ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2.11.2.2 Infusion และ Extracts : เป็นสารสกัดจากเซลล์ต่างๆ ทั้งจากจุลชีพ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็นจริงถือว่าเป็น Peptone ชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช (เช่น Malt Extract) และจากสัตว์ (เช่น Beef Extract Brain- Heart infusion) เป็นสิ่งที่ใช้แทน Peptones ก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิต Peptones ขึ้นมาใช้งาน ซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจน โดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน Polypeptides, aminoacids คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth factors หลายชนิด

2.11.2.3 Solidifying agents : เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัว และกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารพวกนี้ได้แก่ วุ้น (Agar) , Gelatin , Silica gel และ Polyacrylic gels แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ วุ้น ซึ่งเป็น Polysaccharides ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) วุ้นที่ดีควรสะอาดปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 °C เมื่อเตรียมวุ้นความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก / ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัว สิ่งที่ได้ควรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อย ส่วน Solidifying Agents อื่นๆ นั้นไม่ค่อยมีผู้นิยม

2.11.2.4 Indicators : ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมี Indicators 2 ประเภทคือ

2.11.2.4.1 Indicators เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ Phenol red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral red, litmus, andrade's indicator เป็นต้น

2.11.2.4.2 Indicators เพื่อบอกสภาวะ Oxidation- reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Methylene Blue และ Resazurin เป็นต้น

2.11.2.5 เกลือ (Salt ;NaCl) ใช้เติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น Isotonic สำหรับเซลล์แบคทีเรีย หรือเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นไปตามที่แบคทีเรียต้องการ

2.11.2.6 Dextrose ใช้เพื่อเป็นแหล่งของ Carbon และพลังงานแก่แบคทีเรีย

2.11.2.7 น้ำ ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่น (distilled water)

2.11.2.8 Selective agent : เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้เท่านั้น โดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญ การใส่ selective

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งเป็นตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค selective agents ที่ใช้กันมีหลายชนิดได้แก่ สีย้อมบางชนิด เช่น crystal violet และ brilliant green (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) sodium chloride (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน *Staphylococcus spp.*), sodium azide, sodium citrate , sodium tellurite, sodium lauryl sulfate, sodium Selenite, iodine, phenylethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้การปรับความเป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปกติ (เช่น pH 5.6 ใน abouraud dextrose agar) หรือสูงกว่าปกติ (เช่น pH 8.8-9.0 ใน alkaline peptone water สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio cholerae*) ก็สามารถใช้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

2.11.2.9 Reducing agent ; เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น สารเหล่านี้ได้แก่ ascorbic acid , sodium thioglycolate ,sodium formaldehyde sulfoxylate , thiomalic acid , sodium hydrosulfite , และ cysteine เป็นต้น

2.11.2.10 เลือดใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media

### 2.11.3 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.11.3.1 แบ่งตามลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งได้เป็น

2.11.3.1.1 อาหารแข็ง (Solid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุ้น (Agar) 1.5 – 2 % ขึ้นไป  
2.11.3.1.2 อาหารเหลว (Liquid Media or Broth) คืออาหารที่ไม่มีการเติมวุ้นลงไป หรือหากมีจะน้อยมาก คือน้อยกว่า 0.1 %

2.11.3.1.3 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semisolid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุ้นปริมาณน้อยลงไปประมาณ 0.5 % เพื่อประโยชน์บางอย่าง เช่น ประโยชน์ในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test)

2.11.3.2 แบ่งตามคุณสมบัติของคุณค่าทางอาหารและ Selective Agents ที่เติมลงไป แบ่งได้เป็น

2.11.3.2.1 Chemical Defined Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทราบชนิดและปริมาณที่แน่นอนของสารเคมีที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในงานทั่วไปนัก แต่มักใช้ในงานวิจัยที่ต้องการความละเอียดและแน่นอนมากเป็นพิเศษ

2.11.3.2.2 Plain Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาพอสมควร สามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนมากได้ ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่ Nutrient Broth , Nutrient agar เป็นต้น

2.11.3.2.3 Enriched Media เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยาก (Fastidious bacteria) เนื่องจากไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลยหรือเจริญยาก อาหารชนิดนี้ต้องเติมสารอาหารพิเศษหรือ Growth Factor บางอย่างลงไป เช่น เลือด ซีรั่ม ไข่ น้ำจากช่องท้อง (Ascitic Fluid) หรือ การที่สกัดจากเนื้อเนื้อของสัตว์ เป็นต้น เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น Blood Agar และ Chocolate Agar เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.3.2.4 Enrichment Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้ช่วยในการเจริญของแบคทีเรียชนิดหนึ่งชนิดใดโดยเฉพาะ (ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค) ให้เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ปะปนมาในตัวอย่าง เช่น Selenite broth , tetrathionate broth เป็นต้น

2.11.3.2.5 Selective Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและปะปนอยู่ โดยการเติมสารเคมีบางอย่าง ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ โดยไม่มีผลเสียต่อแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น การเติมสี Crystal Violet Brilliant Green และ เกลื่อน้ำดี (bile salt) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ หรือการเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างของ Selective Media เช่น Brilliant green agar, Salmonella – Shigella agar (SS Agar) Bismuth sulfite agar และ MacConkey agar เป็นต้น

2.11.3.2.6 Differential Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดโดยดูจากความแตกต่างของลักษณะโคโลนีหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Reaction) เช่น Blood agar media เป็นอาหารวุ้นที่เติมเลือด ถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย Lactose broth ใช้แยก

2.11.3.2.7 Differential และ Selective media มีอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นทั้ง Differential media และ Selective Media คือยอมให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้ แต่ไม่ยอมให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เจริญ และในขณะเดียวกันก็ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญอยู่นั้นได้ด้วย เช่น Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งยอมให้แบคทีเรียพวก Vibrio เท่านั้นที่เจริญได้และยังสามารถแยก Vibrio ชนิดที่ใช้ Sucrose และไม่ใช่ Sucrose ออกจากกันได้โดยดูจากสีของโคโลนี หรือ Xylose lysine Dextrolysate Agar (XLD) ที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถใช้และไม่ใช้แลคโตสออกจากกันได้ โดยถ้าแบคทีเรียใช้แลคโตสได้โคโลนีจะมีสีเหลือง ถ้าใช้แลคโตสไม่ได้โคโลนีจะมีสีชมพู และถ้าเป็นแบคทีเรียบางชนิด เช่น Salmonella จะมีลักษณะเฉพาะบน XLD คือ โคโลนีจะมีสีชมพูใสและมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H<sub>2</sub>S) อยู่ตรงกลาง เป็นต้น

2.11.3.2.8 อาหารที่ใช้วิเคราะห์ (Assay Media) เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของ วิตามิน กรดอะมิโนและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ (Disinfectant) ด้วย

2.11.3.2.9 อาหารที่ใช้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (Media for enumeration of bacteria) เป็นอาหารที่ใช้ในการตรวจนับแบคทีเรียบางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือน้ำนม ซึ่งองค์ประกอบของอาหารจะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น ตัวอย่างเช่น Plate count agar และ Marine agar เป็นต้น

2.11.3.2.10 อาหารที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย (Media for characterization of bacteria) ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physical and Biochemical test) เช่น Triple sugar iron agar , Urease test medium , citrate agar , lysine decarboxylase test medium เป็นต้น

2.11.3.2.11 อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Maintenance Media) ใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียไว้ให้นานที่สุดโดยเชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลงและปลดปล่อยของเสียออกมาน้อยลง เช่น ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลงเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็ว ไม่มีคาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน แต่จะประกอบด้วยเกลือแร่ต่างๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเป็นกรด - ต่าง ตลอดจน Oxidation Reduction Potential และความชื้นให้คงที่ เช่น Stuart's transport medium , Cary - Blair transport medium เป็นต้น Transport Media นิยมใช้ในกรณีที่ไม่สามารถนำสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อได้ทันที (ฉัตรชัย และ พิมพ์พันธ์ุ, 2529)

แอกติโนมัยซีทจำนวนมากสามารถใช้สารประกอบเพื่อเป็นแหล่งพลังงานได้หลากหลาย เช่น กลูโคส แป้ง กรดอะมิโน และโปรตีน แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับจุลินทรีย์จะเป็น โปรตีน เปปโตโน กรดอะมิโน ไนเตรต เกลือแอมโมเนียม และยูเรีย แต่ใช้ในปริมาณที่ต่ำ ปัจจัยหลักที่ช่วยในการเจริญของ Actinomycetes คือสารอาหาร (Gil et al., 2009)

## 2.12 นิเวศวิทยาของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีท สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในดิน สภาพดินที่พบ แอกติโนมัยซีท นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้วยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมากๆ ในโคลน แม่น้ำ ใต้ทะเลสาบ แต่ โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร พบว่าในดินทั่วไปมีจำนวนใกล้เคียง กับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นต่าง จะพบแอกติโนมัยซีทในจำนวนมากว่า เช่น ดินที่มี pH 6.5-8 จะมีจำนวนสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินมี pH เป็นต่างทั่วไปจะพบ ประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญของแอกติโนมัยซีทได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อยและจะไม่ค่อยพบในดินที่ ค่อนข้างเป็นกรด (ชนินทร์ และคณะ, 2546)

ในเรื่องของการทนความแห้งแล้ง แอกติโนมัยซีทจะมีความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดี จึงพบแอกติโนมัยซีทในสภาพดินแห้งจำนวนมาก และจากลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีทที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ในสภาพธรรมชาติ แต่แอกติโนมัยซีทมีความสามารถพิเศษในการย่อย สลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอกติโนมัยซีทมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น หลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว สภาพที่เหมาะสมกับแอกติโนมัยซีท คือสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง (งามนิจ, 2547)

## 2.13 การคัดแยกแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทแต่ละกลุ่มจะมีความต้องการอาหารที่แตกต่างกันไป อาหาร Actinomycete isolation agar ใช้เป็นอาหารสำหรับการคัดแยกเชื้อโดยทั่วไป ส่วนวิธีการแยกเชื้อและอาหารที่ใช้ในการ แยกเชื้อเฉพาะกลุ่มจะมีความแตกต่างกันของวิธีการและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่น การคัดแยกเชื้อในสกุล Streptomyces ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซีทที่สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด ควร จะต้องมี โคติน แป้ง กลีเซอรอล อาร์จินิน แอสปาราจีน เคซีน และไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนเพื่อการเจริญ และจะต้องมีการเติมสารแอนติไบโอติกในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อราในความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อลิตร เช่น cycloheximide หรือ nystatin และควรบ่มจานเพาะเลี้ยงไว้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เรียกว่ายาก จะต้องมีการนำดินตัวอย่างไป ทำ pre-treatment ด้วยวิธีการต่างๆ (Maitra and Roy, 1960) (Strzelczyk and Leniarska, 1985)

ก่อนที่จะนำดินนั้นมาทำการคัดแยก เพื่อเป็นการกำจัด แบคทีเรียและเชื้อราในดินออกบ้าง ขณะเดียวกันก็เป็นการลดจำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่ต้องการลง และกระตุ้นการงอกของสปอร์แอกติโนมัยซีทที่อยู่ในระยะพักให้พร้อมที่จะเจริญขึ้น รวมถึงเพื่อกำจัดแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว และแอกติโนมัยซีทที่ไม่ต้องการอีกด้วย (รัตนภรณ์ และคณะ, 2548)

## 2.14 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีท

ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์สารสี หรือ สารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยซีส (45%) เชื้อรา (38%) และ แบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็น เชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่ สร้างจากแอกติโนมัยซีททั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990)

เอนไซม์ที่แอกติโนมัยซีท สามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น เอนไซม์ amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแบ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สามารถผลิต amylase ได้ได้แก่ *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 1996)

เอนไซม์ amylase สามารถนำไป ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือ การผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ chitinase ที่มี คุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา หรือเป็นองค์ประกอบของ exoskeleton ของพวก arthropod จินัสที่สามารถผลิต chitinase ได้ ได้แก่ *Streptomyces* (Benimeli *et al.*, 2008)

เอนไซม์ chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้เช่น นำมาทำ protoplast ของรา เพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ การนำมาเป็นสารควบคุมทางชีวภาพเช่นใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และการนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น (Dahiya *et al.*, 2006)

แอกติโนมัยซีทบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บาง ชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette *et al.*, 2005)

## 2.15 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอกติโนมัยซีท

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแหล่งธรรมชาติยังมีการค้นหามากมายไม่หยุดยั้งเนื่องจากมีผลประโยชน์ทางอุตสาหกรรม ทางการแพทย์ ทางเภสัช และทางการเกษตร สารเหล่านี้ได้มาจากพืชหรือจุลินทรีย์แอกติโนมัยซีท เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น *Streptomyces* สามารถสร้างสารประกอบบางอย่างที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดอื่น การหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ กลุ่มนี้โดยการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่หายาก (rare actinomycetes) หรือกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่เจริญช้า และพบได้น้อยในธรรมชาติ เช่น *Micromonospora*, *Microbispora* เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีมากมายหลายชนิด โดยที่ 2 ใน 3 ของสารปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์นั้นมาจากแอกติโนมัยซีท (สายสมร, 2547)

การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะเป็นกระบวนการทำลายการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยการทำลายที่เยื่อหุ้มเซลล์ ยังยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นไม่สามารถแบ่งตัว จึงหยุดการเจริญเติบโตในที่สุด (ครราวรรณ และ นันคนา, 2547)

โดยสารปฏิชีวนะมีหลายกลุ่มคือ

#### 1. สารปฏิชีวนะในกลุ่ม peptide antibiotic

เป็นสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญ และใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับสารปฏิชีวนะใน กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่มย่อยคือกลุ่ม beta -lactam ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้จากจุลินทรีย์หลายกลุ่มคือ

a. bacteria (เช่น *Streptomyces*, *Bacillus*)

b. fungal (เช่น *Penicillium*, *Tolyocladium*, *Aspergillus*)

c. cyanobacteria (เช่น *Anabaena*, *Microcystis*)

นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม GPAS (glycopeptide) เช่น สาร vancomycin ที่ผลิตจาก *Actinoplanes*, มีสาร complestatin ที่ผลิตจาก *Streptomyces* และกลุ่ม cyclic peptide ที่ผลิตสาร cyclosporine จาก *Tolyocladium* กลุ่ม thiopeptide ที่ผลิตสาร thiostrepton และ nonsiheptide จาก *Streptomyces* กลุ่ม lipopeptide ที่ผลิตสาร daptomycin จาก *Streptomyces roseosporus*

#### 2. สารปฏิชีวนะในกลุ่ม amino glycoside และ oligosaccharide

ซึ่งผลิตสาร streptomycin และ kasugamycin จาก *Streptomyces*

#### 3. สารปฏิชีวนะในกลุ่ม peptidyl nucleoside

ซึ่งผลิตสาร nikkomycin, blasticidin และ puromycin

#### 4. สารปฏิชีวนะในกลุ่ม polyketide ชนิดที่ 1, 2 และ 3

#### 5. สารปฏิชีวนะที่เป็นสารประกอบอื่นๆ (สายสมร, 2547)

### 2.16 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography หรือ TLC) (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2559)

ทินแลร์โครมาโตกราฟี (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม

หลักการของ TLC นั้น คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี จะต่างกันก็เพียงแต่ในกรณีของ TLC วัฏภาคหนึ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระดาษ แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบางๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตั้ง ๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะทำให้สารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดี ด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี

เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบตั้งในกรณีของคอลัมน์โครมาโตกราฟี ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหา ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (โดยการใช้วัฏภาคนิ่งชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำ TLC ) รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย

ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลายรวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่ขั้วจึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น (เพราะเหตุใด?)

TLC เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง (ขนาด  $5 \times 10$  ซม<sup>2</sup> หรือ  $5 \times 20$  ซม<sup>2</sup>) เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็นชั้นบางๆ (หนาขนาด 0.25-0.3 มม.) ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ก็เช่นเดียวกับที่ใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา คีเซลทัวร์ (kieselguhr) และผงเซลลูโลส เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสง UV

#### ขั้นตอนการทำ TLC

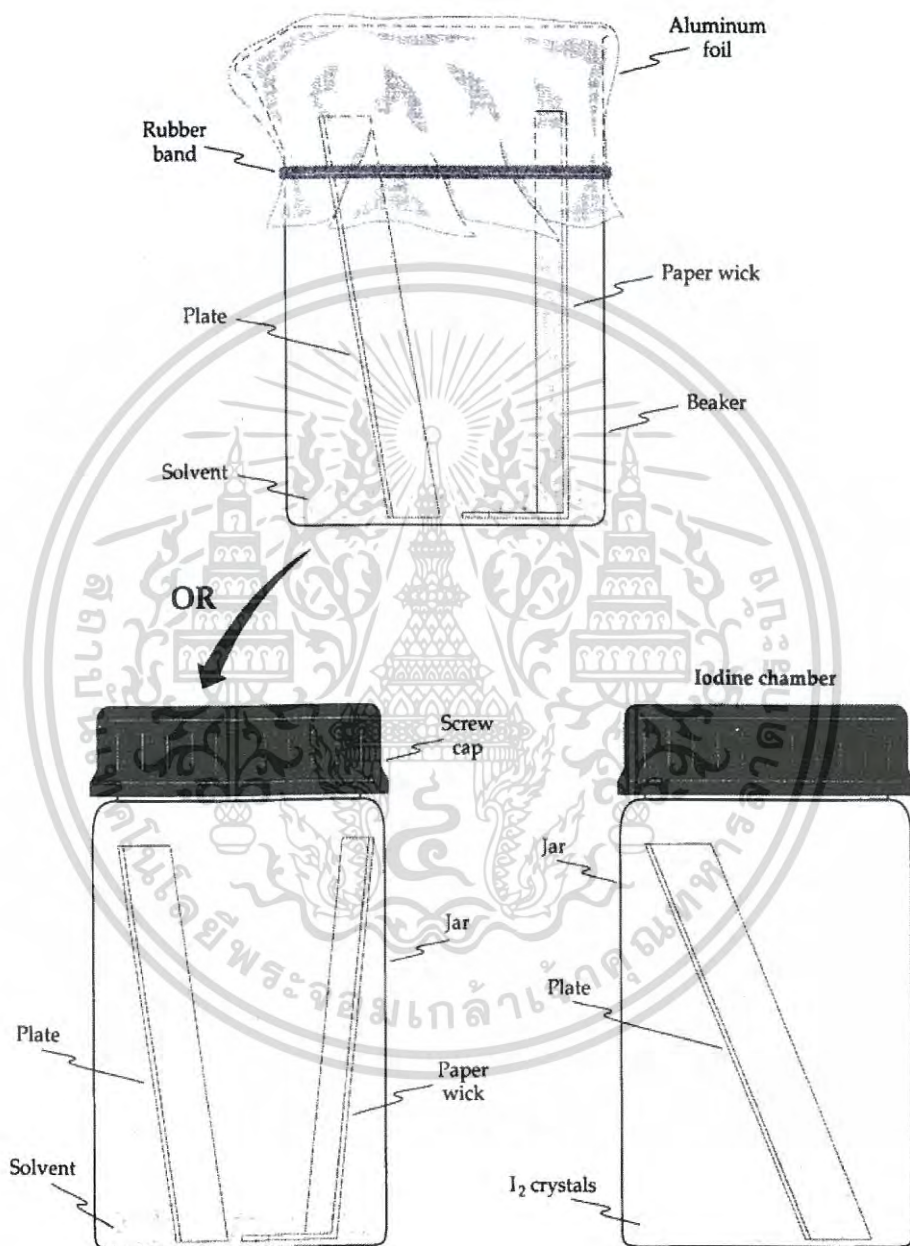
การทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคนิ่งเคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้เอง โดยจุ่มแผ่นกระจก (ขนาดประมาณแผ่นสไลด์ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์) ที่สะอาดลงในสารแขวนลอยที่ชั้นเหลว (slurry) ของสารที่เป็นวัฏภาคนิ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้การเคลือบที่สม่ำเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ในปัจจุบันมีการทำแผ่นทินเนอร์สำเร็จรูปซึ่งเคลือบวัฏภาคนิ่งไว้บนแผ่นอะลูมิเนียมบางๆจำหน่าย โดยมีผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่งจะช่วยให้สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้สะดวก

ควรเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 % แม้ว่าตัวอย่างนั้นจะเป็นของเหลวอยู่แล้วก็ตาม แล้วแต้ม (spotting) ลงบนแผ่นทินเนอร์ ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 cm นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายสูงไม่เกินระดับที่แต้มสารตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสารตัวอย่าง) และอ้อมตัวด้วยโอของตัวทำละลาย (ซึ่งต้องเตรียมไว้ก่อนหน้านั้นโดยใช้กระดาษกรองบุไว้ที่ผนังด้านในของบีกเกอร์ แล้วปิดด้วยกระดาษฟิวส์) (รูปที่ 9.2) คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า solvent front เมื่อมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น (ห่างจากปลายบนลงมา 0.5-1 cm) ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ใช้ดินสอดขีดบ่งรอย solvent front ไว้เพื่อใช้ในการคำนวณค่า  $R_f$  (retention factor) ต่อไป ระหว่างที่รอต้องแน่ใจว่าแผ่น TLC อยู่ในระบบปิดตลอดเวลา

ค่า  $R_f$  นี้เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการแต้ม ไปยังตำแหน่งสุดท้ายของมัน เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) เนื่องจากสารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่

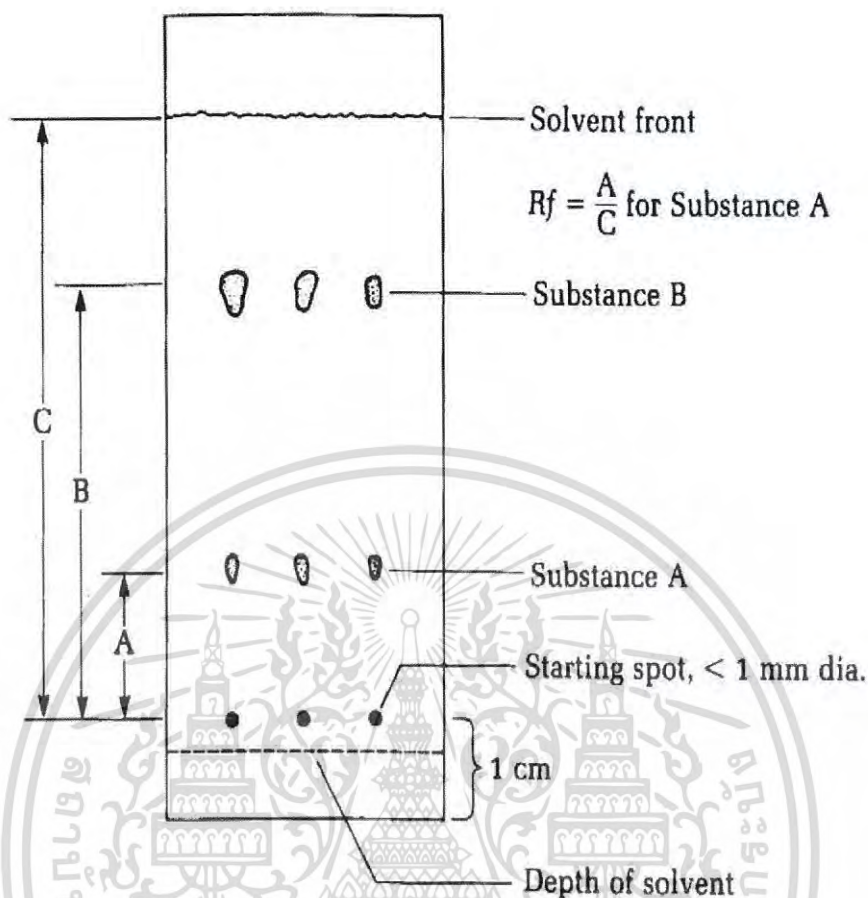
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า  $R_f$  ของสารแต่ละชนิด ในวัฏภาคหนึ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน



รูปที่ 2.7 การวางแผ่น TLC ที่แต้มสารแล้วลงในบีกเกอร์หรือขวดที่บรรจุตัวทำละลาย และการนำแผ่น TLC ที่ทำโครมาโตกราฟีเสร็จแล้วไปอังไอระเหิดของไอโอดีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำ TLC และการคำนวณ  $R_f$

ในกรณีที่ต้องประกอบในสารตัวอย่างมีสีทุกองค์ประกอบจะสามารถเห็นจุดของแต่ละองค์ประกอบที่เคลื่อนที่ไปได้ แต่ก็มีสารจำนวนมากที่ไม่ให้สี โดยทั่วไปสารอินทรีย์ทั้งหลายที่ถูกดูดซับอยู่บนแผ่นทินแลร์ จะให้จุดสีได้เมื่อนำแผ่น TLC ไปวางในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีนอยู่ 2-3 เกล็ด (รูปที่ 9.2) ทั้งนี้เนื่องจากไอของไอโอดีนจะถูกดูดซับโดยจุดของสารเกิดเป็นสีม่วงน้ำตาลขึ้น ซึ่งผู้ทดลองต้องรีบใช้ดินสอวงไว้ทั้งนี้เพราะสีจะจางลงเรื่อยๆ

อีกวิธีหนึ่ง ในการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีก็คือ การใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่มีการผสม fluorescent indicator (ซิงค์ซัลไฟด์) อยู่กับซิลิกาเจลที่ฉาบไว้บางๆ ซึ่งจะทำให้แผ่น TLCเรืองแสงได้เมื่อส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่นเหมาะสม เมื่อทำการแยกแล้วให้นำแผ่น TLC มาส่องกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (อันตราย ! แสง UV เป็นอันตรายต่อดวงตาและผิวหนัง จึงควรใช้เวลาสัมผัสกับแสง UV ให้สั้นที่สุด) หากสารที่จะวิเคราะห์มีสมบัติเป็นตัวควENCHER จะเห็นจุดสารดูดกลืนแสง UV เป็นสีม่วง สารที่มีสมบัติดังกล่าวได้แก่สารที่มีโครโมฟอร์ เช่น double bond หรือ aromatic ring จึงจะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้ แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี รวมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการแยกได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพงจึงควรใช้อย่างประหยัด

วิธีการของ TLC แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมแผ่น TLC
2. การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC
3. การพัฒนาให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC (Development of TLC plate)
4. การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)
5. การคำนวณหาค่า  $R_f$

### 2.16.1 การเตรียมแผ่น TLC

นำตัวดูดซับมาผสมกับน้ำทำเป็นสเลอรรี่ (slurry) สกัดส่วนของตัวดูดซับกับตัวทำละลาย ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำสเลอรรี่ที่ผสมกันดีแล้วมาเคลือบเป็นชั้นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกที่สะอาดและแห้ง ตัวดูดซับมักมีตัวยึด (binder) เช่น calcium sulfate (Plaster of Paris) หรือแป้งผสมอยู่เล็กน้อยเพื่อให้ตัวดูดซับยึดกับแผ่นแก้วหรือพลาสติก แผ่น TLC อาจเตรียมในห้องปฏิบัติการก่อนใช้หรือซื้อแผ่น TLC ที่ผลิตสำเร็จรูปมาใช้

### 2.16.2 การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC

ใช้หลอดแคปิลลารี (capillary) ขนาดเล็กมาดูดสารละลายของสารตัวอย่าง แล้วจุดบนแผ่น TLC ควรจุดให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางของจุดไม่ควรเกินกว่า 2 มม. รอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้งก่อนทำขั้นตอนต่อไป

### 2.16.3 Development ของ แผ่น TLC (Development of TLC plate)

นำแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยให้ ตำแหน่งจุดอยู่เหนือตัวทำละลาย ภายในภาชนะแก้วควรใส่กระดาษกรอง (รูปที่ 2.9) และปิดฝาภาชนะให้สนิทเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นด้านบนได้เร็วขึ้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนถึงขอบบน ให้นำแผ่น TLC ออกพร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้ง ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่มีส่วนสำคัญต่อการคำนวณค่า  $R_f$



รูปที่ 2.9 Development ของแผ่น TLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.16.4 การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)

การตรวจหาตำแหน่งของจุดบนแผ่น TLC จะง่ายมากถ้าเป็นสารประกอบที่มีสี แต่ถ้าเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี มีวิธีการตรวจหาได้หลายวิธีดังนี้

2.16.4.1 มองแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ในที่มืด สารประกอบที่เกิดฟลูออเรสเซนส์ จะเกิดความสว่างมากภายใต้แสง UV เครื่องที่ให้กำเนิดแสง UV เรียกว่า Ultraviolet lamp ตัวดูดซับมักมีสารเรืองแสงซึ่งเป็นสารผสมของ cadmium sulfide และ zinc sulfide ปนอยู่ ดังนั้นเราจะสังเกตเห็นแสงสีเขียวสว่างทั่วแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ในที่มืด ถ้าสารตัวอย่างดูดกลืนแสง UV แสง UV ตรงตำแหน่งที่สารอยู่จะถูกดูดกลืน ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวมืดลงและเห็นเป็นจุดมืด ถ้าสารตัวอย่างเป็นสารเรืองแสงและเรืองแสงเป็นสีอื่นที่ไม่ใช่สีเขียว ก็ช่วยให้สังเกตเห็นง่ายขึ้น

2.16.4.2 นำแผ่น TLC มาใส่ในภาชนะที่มีผลึกของไอโอดีนอยู่ ถ้าทิ้งแผ่น TLC ไว้ จะเห็นจุดสีน้ำตาลเกิดบนแผ่น TLC จุดสีน้ำตาลเกิดจากสารประกอบอินทรีย์ (ยกเว้น alkanes และ alkylhalides) เกิดโมเลกุลเชิงซ้อนกับไอโอดีน

2.16.4.3 ฉีดพ่นแผ่น TLC ด้วยสารเคมี เช่น กรดซัลฟูริกเข้มข้น , กรด  $H_2SO_4 + HNO_2$  ,  $H_2SO_4 + Na_2Cr_2O_7$  หรือ  $H_2SO_4 + K_2Cr_2O_7$  เมื่อฉีดแล้วให้ความร้อนกับแผ่น TLC ที่  $100^\circ C$  เป็นเวลา 2-3 นาที จะเห็นจุดดำบริเวณที่มีสารตัวอย่างอยู่

2.16.4.4 การตรวจสอบกรดอะมิโน ให้ฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (ninhydrine) จะเห็นเป็นจุดสีม่วงปรากฏตรงบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

2.16.4.5 การตรวจสอบ alkyl halides ให้ฉีดพ่นสารละลายเจือจางของ silver nitrate บนแผ่น TLC จะเกิด silver halides Silver halides จะสลายตัวเมื่อถูกแสง ทำให้เกิดจุดดำ (เป็น Ag อีสระ) บนแผ่น TLC

การคำนวณหาค่า  $R_f$

ค่า  $R_f$  เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ , ตัวทำละลาย และความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ค่านี้แปรเปลี่ยนได้ถ้าสภาวะในการทดลองเปลี่ยนค่า  $R_f$  ถูกนิยามไว้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

### 2.16.5 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC

ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นภาคเคลื่อนที่ อาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือเป็นตัวทำละลายผสม การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมควรทำอย่างมีระบบดังนี้ จุดสารตัวอย่างที่เป็น สารผสมลงบนแผ่น TLC หลายๆ แผ่น เลือกตัวทำละลายหลายๆ ระบบ เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล ตามลำดับ (ตัวทำละลายเรียงลำดับจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพ ขั้วสูง) แล้ววางแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างแล้วลงในตัวทำละลายแต่ละชนิดๆ ละ 1 แผ่น หาค่า  $R_f$  ของแต่ละแผ่นในตัวทำละลายที่ต่างกัน เลือกตัวทำละลายที่สามารถให้ผลการแยกที่ชัดเจน

### 2.16.6 ประโยชน์ของ TLC

2.16.6.1 ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยการเปรียบเทียบค่า  $R_f$  ของสารตัวอย่างกับสารแท้ (authentic sample) เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกันในงานวิจัย เกี่ยวกับการสังเคราะห์สาร ถ้าต้องการพิสูจน์ว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเป็นสารที่ต้องการหรือไม่ ให้หาสารตัวเดียวกันนี้ที่ได้จากปฏิกิริยาอื่นมาจุดบนแผ่น TLC เทียบกับสารที่ เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปฏิกิริยา ก็จะทราบว่าปฏิกิริยาที่วางแผนไว้ได้ผลตามที่ต้องการหรือไม่ เป็นวิธีตรวจสอบผลขั้นต้นที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น

2.16.6.2 ใช้ตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาโดยหาค่า Rf ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ เมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นย่อมมีปริมาณน้อยลง ส่วนผลิตภัณฑ์ย่อมมีมากขึ้น เราสามารถใช้ TLC ตรวจสอบระยะเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

2.16.6.3 ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ยอมให้จุดเพียงจุด เดียวบนแผ่น TLC ในทุกระบบตัวทำละลาย (Preparative Thin-layer Chromatography (PLC), 2559)

### 2.17 Phospholipid

Phospholipid เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ Phospholipid แสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ และบริเวณที่ชอบน้ำในโมเลกุล นอกจากนี้ Phospholipid ยังมีความสำคัญในการจำแนกแอกติโนมัลลิตในระดับสกุล แบ่งเป็น 5 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอกติโนมัลลิต (Lechevalier et al., 1997)

Phospholipid type	PIMs	PI	PC	PG	PE	PME	GluNU	APG	DPG
I	+	+	-	v	-	-	-	v	v
II	+	+	-	v	+	-	-	v	+
III	v	+	+	v	v	+	-	v	v
IV	ND	+	-	-	v	v	+	-	+
V	ND	+	-	+	v	-	+	v	+

หมายเหตุ v, variable; +, present; -, absent; PIM, Phosphatidylinositolmannosides; PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholin; PG , Phosphatidylglycerol; PE , Phosphatidylethanolamine; PME, Phosphatidylmethylethanolamine; GluNU, unknow glucosamine-containing Phospholipids; APG, acyl phosphatidylglycerol และ DPG, diphosphatidylglycerol

ในปี ค.ศ. 1981 Lechevalier และคณะ ได้จัดรูปแบบของ phospholipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ดังนี้

PI ประกอบด้วย phospholipid แทบทุกชนิดยกเว้น phosphatidyletanolamine (PE), methyl-phosphatidylethanolamine (methyl-PE), OH-phosphatidylethanolamine (OH-PE), phosphatidylcholine (PC) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu)

PII ประกอบด้วย phosphatidyletanolamine (PE), methyl-phosphatidyletanolamine (methyl-PE) และ OH- phosphatidyletanolamine (OH-PE) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลัก แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIII ประกอบด้วย phosphatidylcholine (PC) เป็นหลักอาจจะไม่มีหรือไม่มี phosphatidyletanolamine (PE) แต่ไม่มี phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

PIV ประกอบด้วย phosphatidyletanolamine (PE) และ phospholipid ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์แต่ไม่มี phosphatidylcholine (PC) เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์

## 2.18 ลักษณะดินป่าชายเลนจังหวัดสมุทรปราการ

ดินป่าชายเลนในจังหวัดสมุทรปราการ สามารถขุดหน้าตัดดินได้ ลึกประมาณ 40 เซนติเมตร เกือบทั้งหมดเป็นดินเหนียวที่มีเนื้อละเอียดมาก (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร) ส่วนมากมีกลิ่นของซากพืช ซากสัตว์ดินส่วนใหญ่มีสีในกลุ่มสีน้ำตาล (7.5YR) และกลุ่มสีเทาอมฟ้า (G2) 4 ที่ความลึก 0-5 เซนติเมตร อุณหภูมิดินอยู่ในช่วง 27.0-31.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 29.0 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.0-6.4 จัดอยู่ในกลุ่มดินที่มีความเป็นกรดปานกลาง ส่วนที่ความลึก 5-40 เซนติเมตร อุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 25.0-28.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 26.5 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.2-6.4 จัดอยู่ในกลุ่มดินที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย ที่ความลึกจากผิวดินลึกลงไปถึงระดับ 40 เซนติเมตร บนพื้นที่หน้าตัดส่วนมากพบรากไม้ปะปน และปริมาณจุดประ (Jarosite) ในชั้นหน้าตัดดินระหว่างร้อยละ 2-20 แต่ไม่พบหินปะปนในชั้นหน้าตัดดินนี้ ปริมาณคาร์บอนรวมอยู่ในช่วงร้อยละ 1.78-3.67 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 2.73 ปริมาณไนโตรเจน รวมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.23-0.41 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32 ค่า C:N ratio ของดินโดยรวมของจังหวัดสมุทรปราการ เท่ากับ 8.5:1 บ่งชี้ว่าดินเลนบริเวณนี้มีไนโตรเจนในปริมาณที่ค่อนข้างมากเกินไป เทียบกับปริมาณคาร์บอนในดิน ปริมาณฟอสฟอรัสรวมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.100-0.141 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.120 (กรมทรัพยากรป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

1. ซ้อนสแตนเลส
2. ถังพลาสติกเก็บตัวอย่าง
3. กระดาษวัดพีเอช (pH paper)
4. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
5. หลอดทดลอง (Test tube)
6. ปิเปตต์แก้ว (Pipette)
7. บีกเกอร์ (Beaker)
8. กระจกทรง (Cylinder)
9. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
10. แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
11. หลอดหยด (Dropper)
12. ซ้อนตักสาร (Spatula)
13. ขวดตูแรน
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
15. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
16. หัวงเขี่ยเชื้อ (Loop)
17. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
18. คีมคีบ (Forceps)
19. สำลี (Non-absorbent cotton wool)
20. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
21. หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก (Centrifuge tube)
22. แผ่นสไลด์ (Slide)
23. กระจกปิดสไลด์ (Coverslip)
24. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
25. ขวดลดความดัน (Suction flask)
26. กรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
27. กระดาษกรอง Whatman no.1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
28. TLC tank
29. TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> plate 20x20 cm ยี่ห้อ Kiesel Gel
30. Spray gun

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 เครื่องมือ

- |   |   |
|---|---|
| 1. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow)                         | TELSTAR TECHNOLOGIES S.L.<br>รุ่น BIO-II-Advance 4, Spain |
| 2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)                      | HIRAYAMA รุ่น HVE-50, Japan                               |
| 3. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)                         | บริษัท OHAUS รุ่น STARTER 3000, USA                       |
| 4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง                        | Sartorius รุ่น TE214S                                     |
| 5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)                    | บริษัท Memmert, Germany                                   |
| 6. ตู้ฆ่าเชื้อ 180 องศาเซลเซียส                       | รุ่น 110 บริษัท Memmert, Germany                          |
| 7. ตู้ลมร้อน (Hot air oven)                           | รุ่น 110 บริษัท Memmert, Germany                          |
| 8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)                            | รุ่น 600 บริษัท Memmert, Germany                          |
| 9. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)                        | รุ่น G560E, U.S.A.  |
| 10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)                   | HERMLE Labotechnik GmbH รุ่น Z 383 K,<br>Germany          |
| 11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)                   | HERMLE Labotechnik รุ่น Z326K, Germany                    |
| 12. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)                       | บริษัท Olympus, Japan                                     |
| 13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง<br>(Spectrophotometer) | UV-1201V ยี่ห้อ SHIMADZU1                                 |
| 14. ตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker)                 | ยี่ห้อ Gallenkamp   |
| 15. โถดูดความชื้น (Desiccator)                        |   |
| 16. เครื่องกรองสูญญากาศ                               | บริษัท GE Motor&industrial system รุ่น<br>G588DX          |
| 17. เครื่องปั่นระเหยในสูญญากาศ<br>(Vacuum centrifuge) | ยี่ห้อ TOMY รุ่น MV-100, Japan                            |
| 18. ตู้ดูดควัน  | Science technology  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Starch – Casein agar (SCA)	ภาคผนวก ก
2. International Streptomyces Project agar, ISP medium no.2	ภาคผนวก ก
3. Skim milk agar	ภาคผนวก ก
4. Bouillon gelatin broth	ภาคผนวก ก
5. Peptone KNO <sub>3</sub> broth	ภาคผนวก ก
6. Inorganic salts starch agar, ISP medium no.4	ภาคผนวก ก
7. Yeast extract - malt extract broth (YEME broth)	ภาคผนวก ก
8. Skim milk 10%	ภาคผนวก ก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 สารเคมี

1. Cycloheximide ( $C_{15}H_{23}NO_4$ ) MW 281.35 g/mol
2. ฟีนอล ( $C_6H_6O$ ) MW 94.11 g/mol บริษัท Fisher
3. แอกอฮอล์ 70%
4. แอกอฮอล์ 95%
5. โพแทสเซียมไนเตรต ( $KNO_3$ ) MW 101.11 g/mol บริษัท BDH  
Chemical Ltd.
6. โซเดียมคลอไรด์ ( $NaCl$ ) MW 58.44 g/mol บริษัท Emsure
7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต  
( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) MW 246.48 g/mol บริษัท Fluka
8. แคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ ) MW 100.9 g/mol บริษัท Univar
9. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต  
( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) MW 278.05 g/mol บริษัท Carlo erba
10. กลีเซอรอล MW 92.095 g/mol บริษัท Carlo erba
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต  
( $K_2HPO_4$ ) MW 174.18 g/mol บริษัท Carlo erba
12. แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ ) MW 132.14 g/mol บริษัท Carlo erba
13. แมงกานีสคลอไรด์เฮปตะไฮเดรต  
( $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ ) MW 197.90 g/mol บริษัท Univar
14. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต  
( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) MW 287.54 g/mol บริษัท Fluka
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $NaOH$ ) MW 39.997 g/mol บริษัท Fisher
16. กรดไฮโดรคลอริก ( $HCl$ ) MW 36.461 g/mol บริษัท Carlo erba
17. สารละลายกรดซัลฟานิก
18. สารละลาย N, N-dimethyl-L-naphthylamine
19. สารละลายแกรมไอโอดีน
20. คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) MW 119.38 g/mol บริษัท Carlo erba
21. เมทานอล ( $CH_3OH$ ) MW 32.04 g/mol บริษัท J.T.Baker
22. กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) MW 32.04 g/mol บริษัท VWR  
Chemical
23. Phospholipids standard ความเข้มข้น 5 mg/mL ได้แก่  
L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt จาก egg  
yolk lecithin (PG), 3-sn Phosphatidylethanolamine  
จาก bovine brain (PE) และ Cardiolipin sodium salt  
จาก bovine heart (CL) (Sigma-Aldrich Chemie) บริษัท Sigma
24. Molybdenum Blue spray reagent บริษัท Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ

#### 1. วิธีเก็บตัวอย่างดิน (Klanbut, 2013)

เลือกจุดการเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่ไม่มีพืชหรือเศษกิ่งไม้ โดยทำการขุดดินลึกลงไป 2-3 เซนติเมตร จากนั้นวัดความเป็นกรดต่างของดิน ควรทำการเก็บตัวอย่างดินจากชายฝั่งจนถึงบริเวณน้ำทะเล จากนั้นเก็บตัวอย่างดินใส่ภาชนะเก็บตัวอย่างและจดบันทึก ความเป็นกรดต่างของดิน ลักษณะของดิน ก่อนนำไปทำการทดลองต้องนำตัวอย่างดินที่เก็บมาแบ่งใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วหรือภาชนะที่สะอาด ตากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ตัวอย่างดินแห้ง

#### 2. การเพาะเลี้ยงและการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (Klanbut, 2013)

ชั่งดินมา 1 กรัม แล้วนำไปใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer กำหนดระดับความเจือจางที่  $10^{-1}$  นำไปป่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง  $10^{-5}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$   $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ตูบสารละลายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate บนอาหารสูตร International *Streptomyces* Project agar (ISP2) ซึ่งเติม Nystatin 100 ไมโครลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับการทดลองต่อไป และกำหนดหมายเลขไอโซเลทของเชื้อ

#### 3. การเตรียม spore suspension ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 30 ไอโซเลท (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในเพลทเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลท บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2) หรือ SFM agar หลังจากนั้นให้ใช้ไม้พินสำลีที่ปราศจากเชื้อ ทำการขูดสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่วจะได้สารละลายสปอร์ (spore suspension) เทกลับลงภาชนะที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ vortex เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อ เพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก และนำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงเทส่วนที่ใสทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด จากนั้นทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

#### 4. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท

##### 4.1 การตรวจลักษณะทางพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท

จำนวน 29 ไอโซเลท (Klanbut, 2013)

การตรวจลักษณะทางพื้นฐานวิทยาจะพิจารณาจากการสร้างสปอร์โดยเลี้ยงบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2) จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปสปอร์ และตรวจผลลักษณะการเจริญของเส้นใยเหนือผิวอาหารและใต้อาหาร สีของเส้นใยอาหารหรือเส้นใย

อากาศ และการสร้างสีที่ตรงควัดดูที่เชื้อสร้าง โดยเทียบกับระดับสีมาตรฐาน ISC-NBS centroid color chart (ภาคผนวก ฉ)

**4.2 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท (Klanbut, 2013)**

#### 4.2.1 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร inorganic salt-starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีที่เชื้อขึ้น แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเห็นเป็นสีน้ำเงินรอบๆโคโลนี

**4.2.2 การย่อยสลายและการตกตะกอนโปรตีนนม (coagulation and pentinization)**

การย่อยสลายโปรตีนในนม ทดสอบโดยถ่ายเชื้อ 1 ลูบลงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 100 ml นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm 15 นาที เก็บส่วนใสมาทดสอบปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Skim milk agar จำนวน 2 จุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม

การตกตะกอนโปรตีนในนม ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในน้ำนม (skim milk) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นพบว่าจากเดิมที่มีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นขาวใส ถ้ามีการตกตะกอนจะมีตะกอนนมตกลงที่ก้นหลอด

#### 4.2.3 การย่อยสลายเจลาติน (gelatinization)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Bouillon Gelatin broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยนำหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อไว้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าเชื้อมีการย่อยสลายของเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

#### 4.2.4 การย่อยสลายไนเตรต (nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร peptone nitrite broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก 2 หยด และสารละลายเอ็นเอ็น-ไดเมทิล-แอล-แนฟโธลามีน 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ สารละลายจะเปลี่ยนสีชมพูจนถึงสีแดงส้ม

### 5. การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญ

#### 5.1. Spore pre-germination และการ Inoculation (Klanbut, 2013)

ทำการดูด spore suspension 500  $\mu$ Lลงในอาหาร 25mL Yeast extract Malt extract (YEME) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 mL บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ 450 nm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์เพื่อทราบปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เท่ากันคือ  $3 \times 10^6$  pre-germinated spores (gs) ในการ inoculate ลงในอาหารเหลวต่อไป โดยคำนวณจากสูตร

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

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

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

5.2 การศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4)

ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง (Balagurunathan *et al*, 2010)

การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท 10 ไอโซเลทในอาหารเหลว Inorganic salts starch agar, ISP medium no.4 (ISP4) ที่ pH 8 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) เลือกมา 1 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้มากที่สุดเพื่อทำการทดลองในชุดถัดไป

การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เลือกมา 1 ไอโซเลทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) โดยปรับให้มีระดับความเป็นกรดต่าง (pH) ที่แตกต่างกันคือ 5, 6, 7, 8 และ 9

การทดลองที่ 3 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท เลือกมา 1 ไอโซเลทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท เลือกมา 1 ไอโซเลทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

โดยแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทในอาหารแต่ละชนิด โดยให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นของแต่ละฟลาสก์มีปริมาณเท่ากันคือ  $3 \times 10^6$  Spore pre-germination และเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันคือ บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองทุก 3 ชั่วโมง รวมเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยกรองเซลล์แอกติโนมัยซีท 5 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (over night) และชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์แอกติโนมัยซีทไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักรวม และหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป

นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{Specific growth rate } (\mu) &= \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{T_2 - T_1} \\ \text{Doubling time } (t_d) &= \frac{\ln 2}{\mu} \\ &= \frac{0.693}{\mu} \end{aligned}$$

โดยที่  $X_1$  = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นของช่วง log phase

$X_2$  = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงสิ้นสุดท้ายของช่วง log phase

$T_1$  = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นของช่วง log phase

$T_2$  = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงสุดท้ายของช่วง log phase

## 6. การสกัดฟอสโฟลิปิด (Klanbut, 2013)

### 6.1 เตรียม Spore pre-germination ดังหัวข้อ 5.1

6.2 ถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ของสารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว ISP2 และอาหารเหลว ISP4 ปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะบ่มเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนของเซลล์ไว้ และเทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นล้างตะกอนเซลล์ 100 มิลลิกรัมของมวลเปียก ซึ่งคาดว่าเท่ากับน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งของเส้นใย ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube อันใหม่ เติมสารละลายของ Chloroform 100 ไมโครลิตร methanol 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 80 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 10 นาที ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Chloroform 100 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน 2-3 นาที เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 100 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างแล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เพื่อแยกชั้นโดยน้ำลอยอยู่ข้างบนและชั้นกลางคือสารละลายของสารอินทรีย์ ชั้นล่างคือตะกอนเซลล์ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอินทรีย์ชั้นกลางใส่หลอดใหม่ แล้วนำไป evaporated ให้แห้งใน vacuum centrifuge หลังจากนั้นทำการ resuspended ใน 3 ไมโครลิตร chloroform ก่อนนำไปหยดตัวอย่างลงบน Kiesel Gel 60 F254 plates 20x20 cm แล้ววางลงใน tank ที่ประกอบด้วยสารละลายตัวพาที่ประกอบด้วย chloroform/methanol/acetic acid/น้ำ (80:12:15:4 [vol/vol/vol/vol]) โดยใน tank บุด้วย chromatography paper (กระดาษ whatman) และทิ้งให้ไอรระเหยเต็ม tank เป็นเวลา 30 นาที จึงวาง TLC plate ลงไปปล่อยให้สารละลายตัวพาวิ่งขึ้นไปประมาณ 4 ใน 5 ของ TLC plate จึงนำออกมาแล้วสเปรย์ด้วยสารละลาย ammonium molybdate จากนั้นเปรียบเทียบกับจุด (spot) ที่ได้เทียบกับ phospholipids standard ความเข้มข้น 5 mg/mL ได้แก่ L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt จาก egg yolk lecithin (PG); 3-sn Phosphatidylethanolamine จาก bovine brain (PE) และ Cardiolipin sodium salt จาก bovine heart (CL) (Sigma-Aldrich Chemie) คำนวณค่า Retention factor (RF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 7. การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

### 7.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10-1 ที่เหลืออยู่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยออกจนหมด และมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบและหลังอบ

### 7.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดิน 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิค บีกเกอร์ หรือภาชนะที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างดิน จากน้ำหนักดินที่หายไป

### 7.3 การวัดค่าความเป็นกรด เบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยๆ โดยในขณะนั้น ให้ทำการคนตัวอย่างของดินไปด้วย ด้วยช้อนคนสารหรือแท่งแก้วคนสาร จนสังเกตเห็นเป็นแผ่นฟิล์มบางๆเกิดขึ้นที่บริเวณผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่ากรด-เบส ทำแบบเดิมซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณแหล่งป่าชายเลนธรรมชาติ ตำบล บางปู จังหวัด สมุทรปราการ 10 ตำแหน่ง นำมาคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจนได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 29 ไอโซเลท ดังวิธีการทดลอง ชั้นที่ 2 แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

จุดเก็บตัวอย่างดิน	หมายเลขไอโซเลท
จุดที่ 1	FAJ 3
จุดที่ 2	FAJ 5
จุดที่ 3	FAJ 6, FAJ 7
จุดที่ 4	FAJ 8, FAJ 9, FAJ 11, FAJ 13
จุดที่ 5	FAJ 14, FAJ 15, FAJ 16, FAJ 31
จุดที่ 6	FAJ 33, FAJ 34, FAJ 36, FAJ 37, FAJ 38, FAJ 39
จุดที่ 7	FAJ 43, FAJ 44
จุดที่ 8	FAJ 45, FAJ 46, FAJ 50
จุดที่ 9	FAJ 51, FAJ 52
จุดที่ 10	FAJ 53, FAJ 54, FAJ 55, FAJ 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสโคติโนมัยซีท

### 4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท

เชื้อแอสโคติโนมัยซีทที่ทำการแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2) ซึ่งเติม Nystatin 100 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเชื้อแอสโคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลท มาทำการ streak บนอาหารสูตร Starch - casein agar (SCA) เพื่อทำการตรวจสอบลักษณะการเจริญ สีของ aerial mycelium และสีของ substrate mycelium และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้โดยเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) และทำการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของแอสโคติโนมัยซีทด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสโคติโนมัยซีทลงบนแผ่นสไลด์จะช่วยให้เห็นลักษณะของเส้นใยและการเรียงตัวของสปอร์ที่แท้จริงชัดเจนและสมบูรณ์ โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

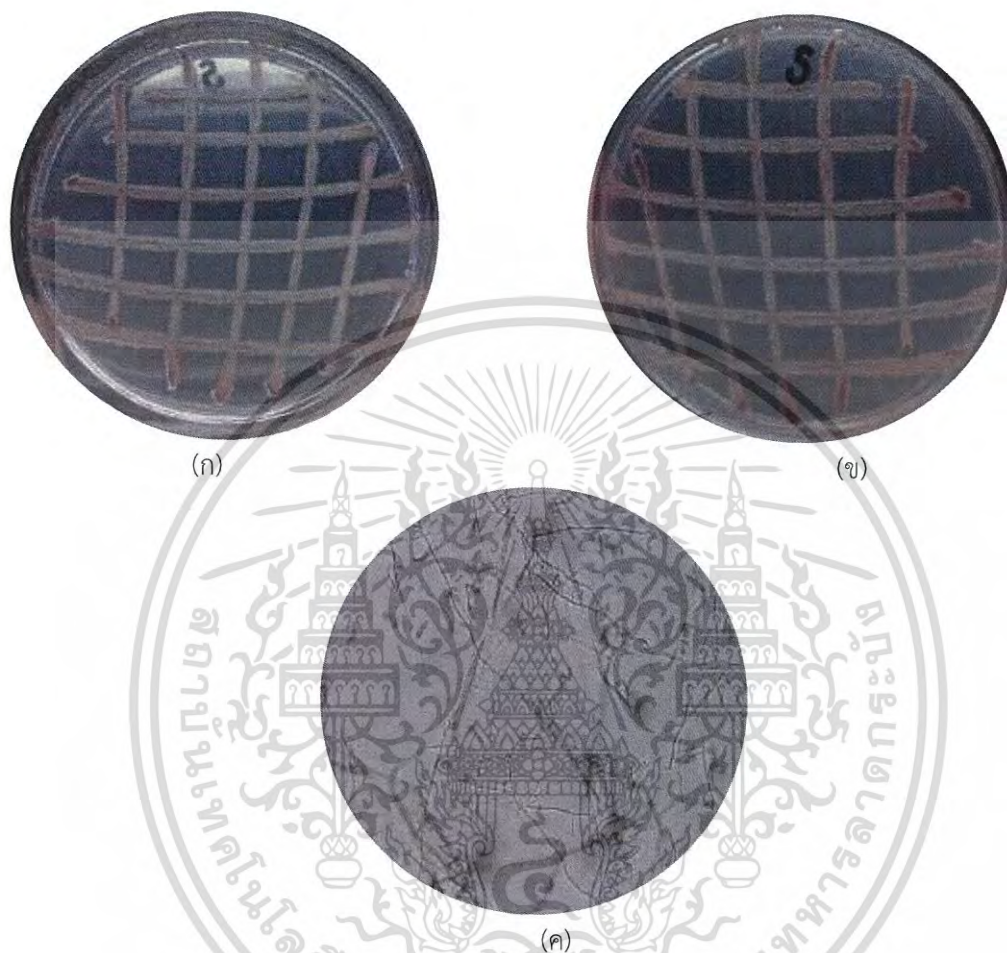
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 3 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Greenish Gray และ substrate mycelium สี Very Pale Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



- รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 3
- (ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 3 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
  - (ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 3 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
  - (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลท FAJ 5 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Strong Red และ substrate mycelium สี Moderate Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลท FAJ 5

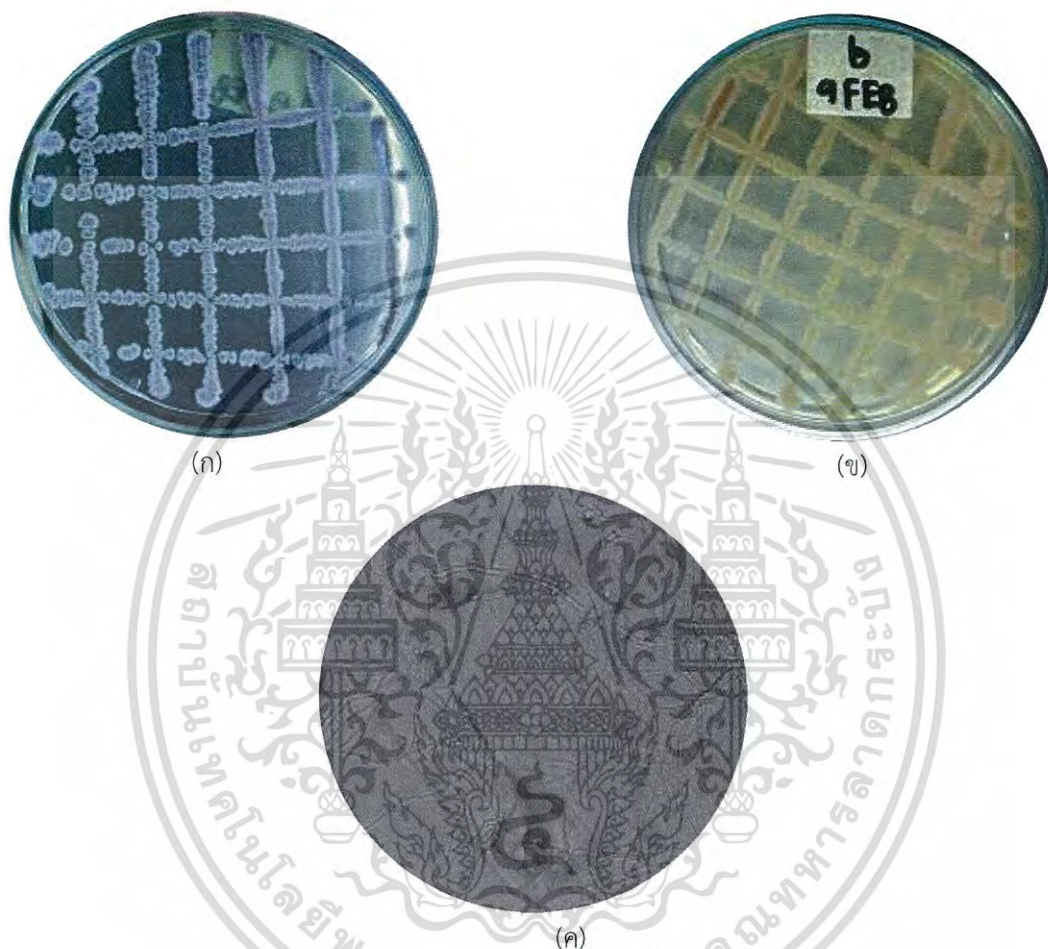
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลท FAJ 5 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลท FAJ 5 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 6 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Dark Greenish Gray และ substrate mycelium สี Deep Yellow สร้างรงควัตถุสี Light Orange ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 6  
 (ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 6 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 6 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน  
 (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 7 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Pink และ substrate mycelium สี Pinkish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 7

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 7 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 7 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 8 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Vivid Red และ substrate mycelium เส้นใยอาหารสี Strong Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 8

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 8 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 8 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลัมสายพันธุ์ FAJ 9 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Orange Yellow และ substrate mycelium สี Brilliant Orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลัมสายพันธุ์ FAJ 9

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลัมสายพันธุ์ FAJ 9 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลัมสายพันธุ์ FAJ 9 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 11 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Brownish Gray และ substrate mycelium สี Light Greenish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 11

- (ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 11 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 11 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 13 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pinkish White และ substrate mycelium สี Light Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะโคโคนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 13

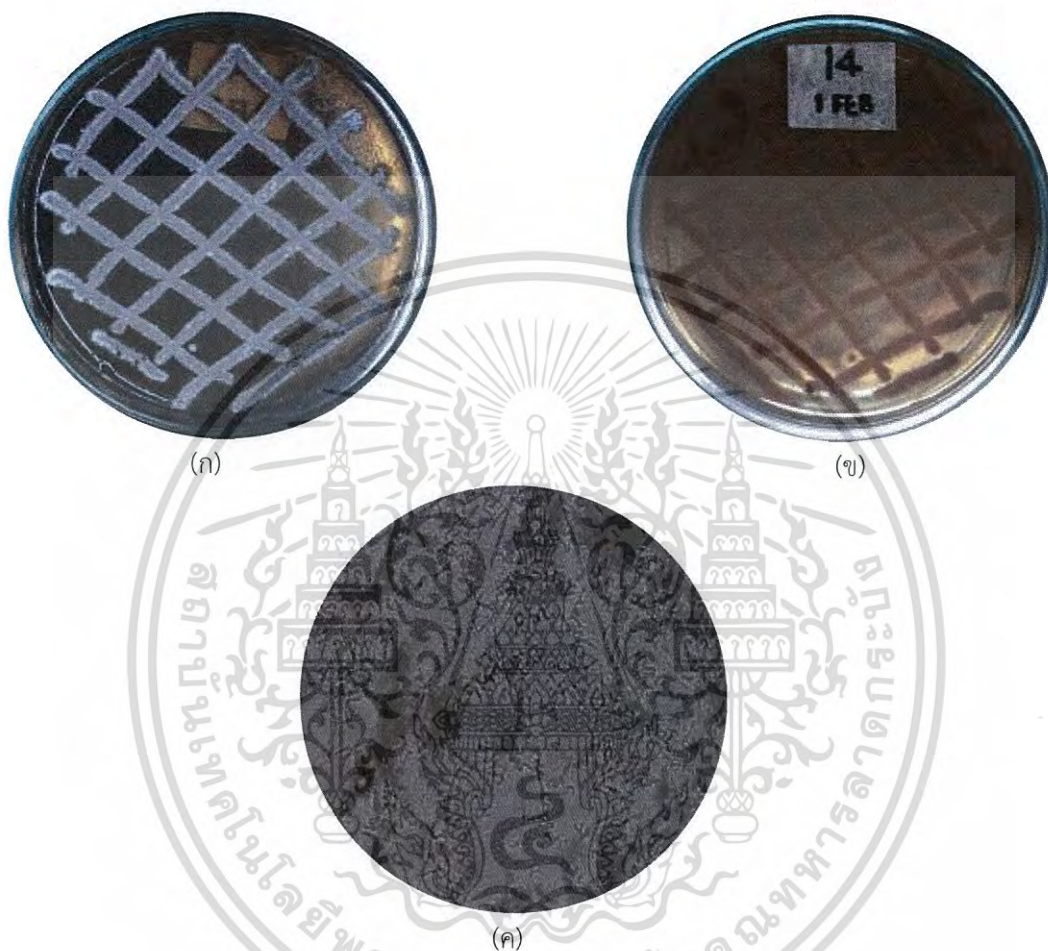
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 13 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 13 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Grayish Brown และ substrate mycelium สี Strong Brown สร้างรงควัตถุที่สี Deep Reddish Brown สร้างสปอร์บิดเป็นเกลียวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 15 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish White และ substrate mycelium สี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 15

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 15 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 15 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 16 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish Gray และ substrate mycelium สี Deep Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International Streptomyces Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 16

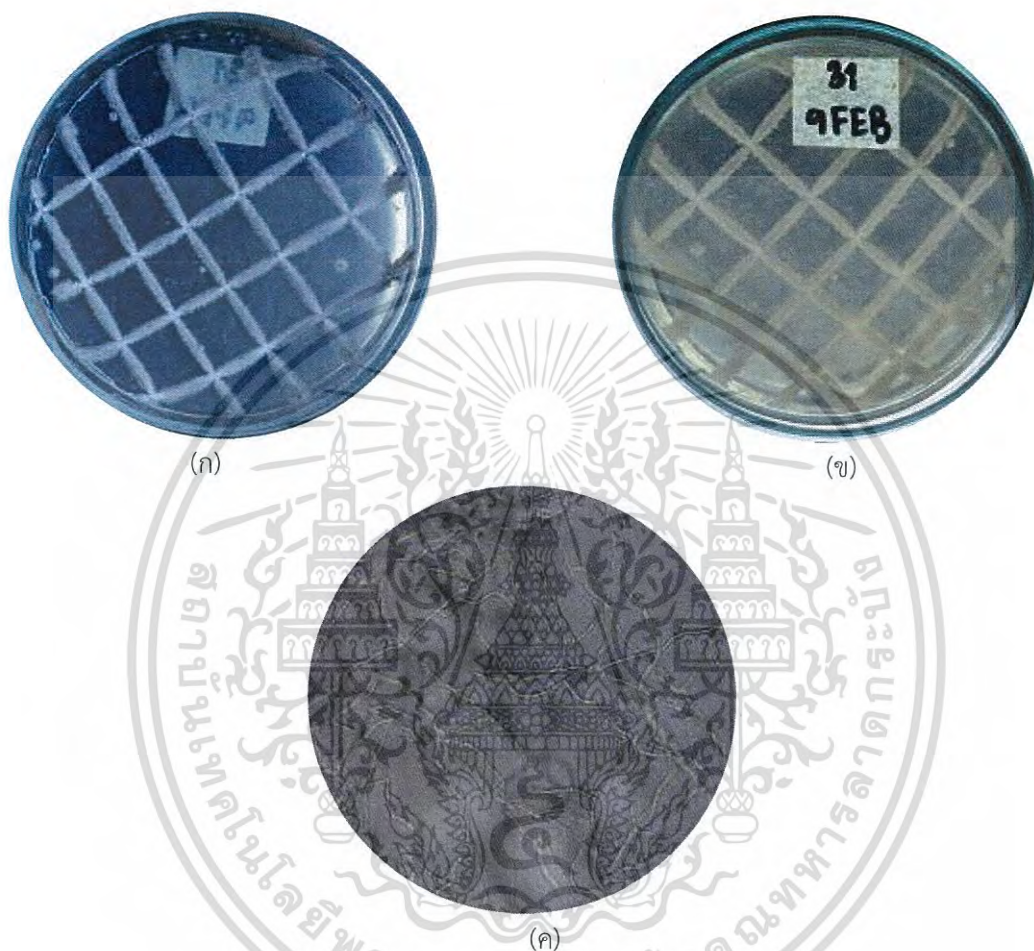
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 16 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 16 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคดีโนไมซีทไอโซเลท FAJ 31 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Greenish Gray และ substrate mycelium สี Light Greenish Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดีโนไมซีทไอโซเลท FAJ 31

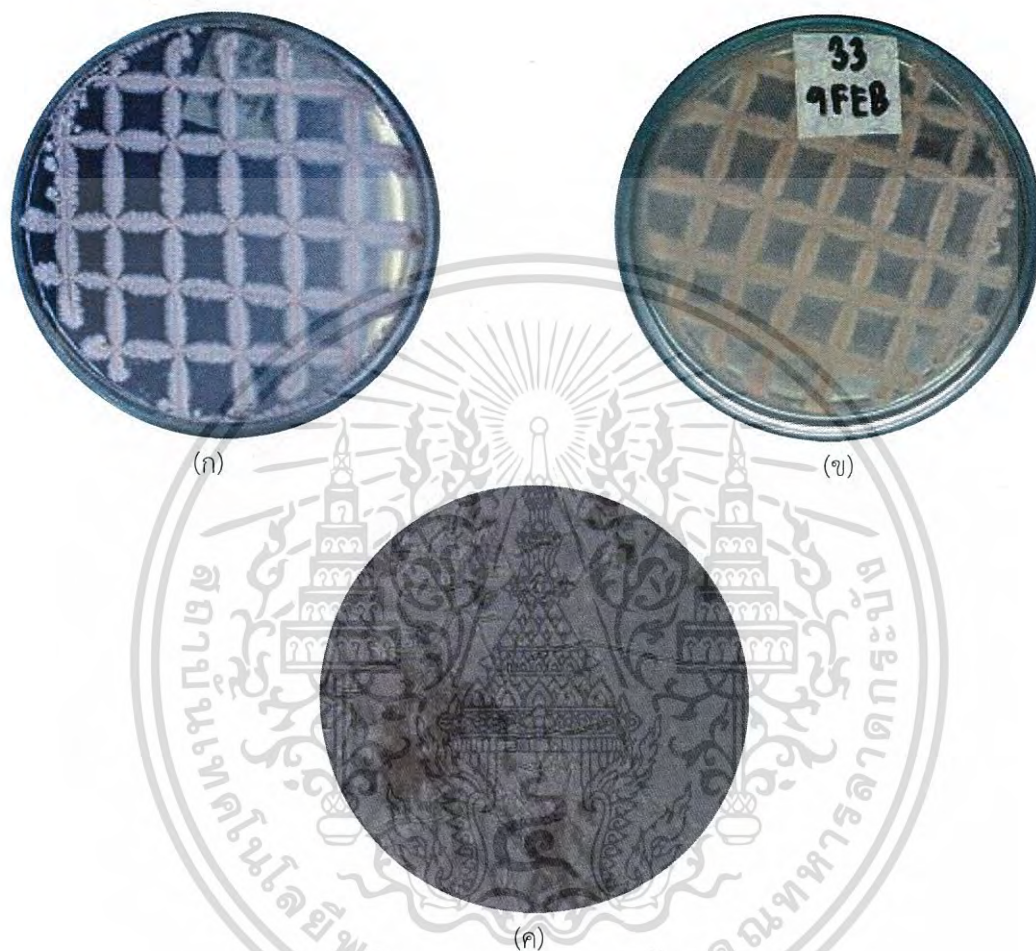
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนไมซีทไอโซเลท FAJ 31 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนไมซีทไอโซเลท FAJ 31 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลไลต์ไอโซเลท FAJ 33 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Pink และ substrate mycelium สี Pinkish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์เป็นเกลียวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลไลต์ไอโซเลท FAJ 33

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลไลต์ไอโซเลท FAJ 33 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลไลต์ไอโซเลท FAJ 33 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 34 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Olive Gray และ substrate mycelium สี Dark Grayish Yellow สร้างรงควัตถุสี Medium Gray ไม่สร้างไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 34

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 34 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 34 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท FAJ 36 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี White และ substrate mycelium สี White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท FAJ 36

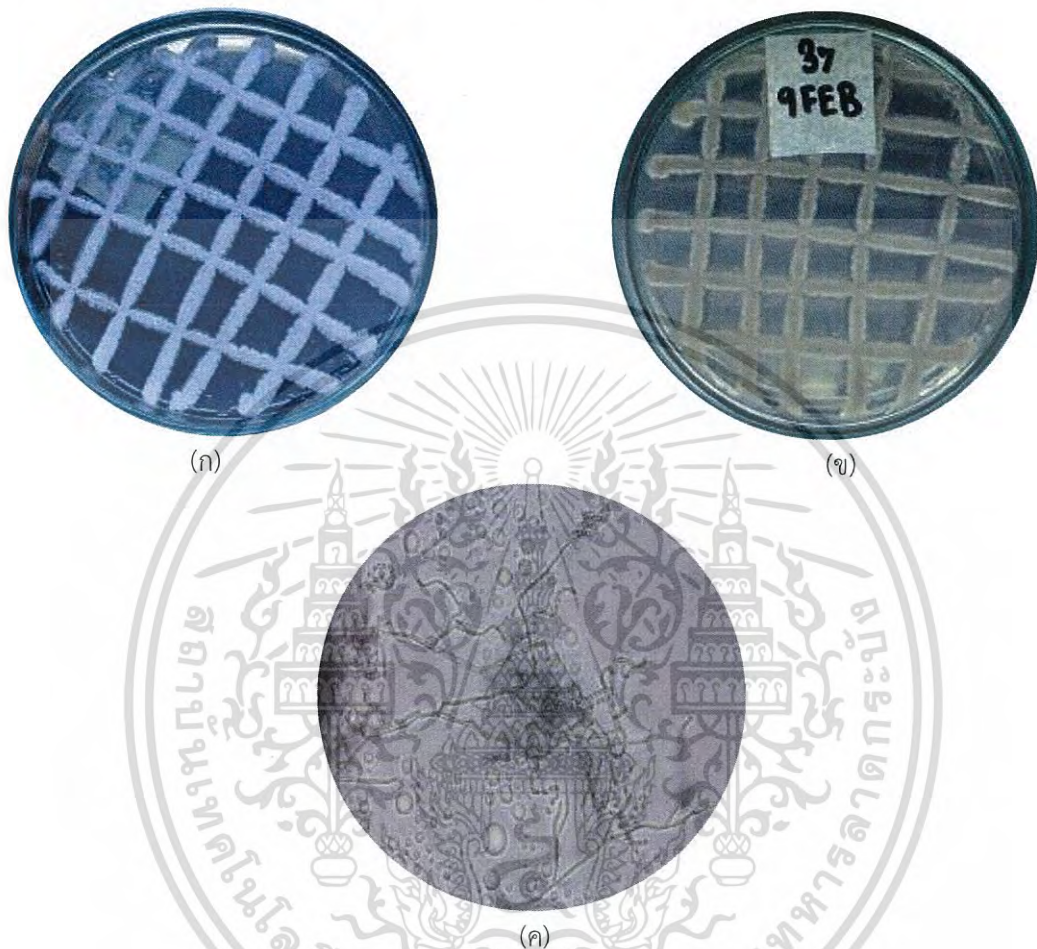
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท FAJ 36 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไอโซเลท FAJ 36 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 37 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี White และ substrate mycelium สี Light Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 37

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 37 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 37 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 38 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish White และ substrate mycelium สี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 38

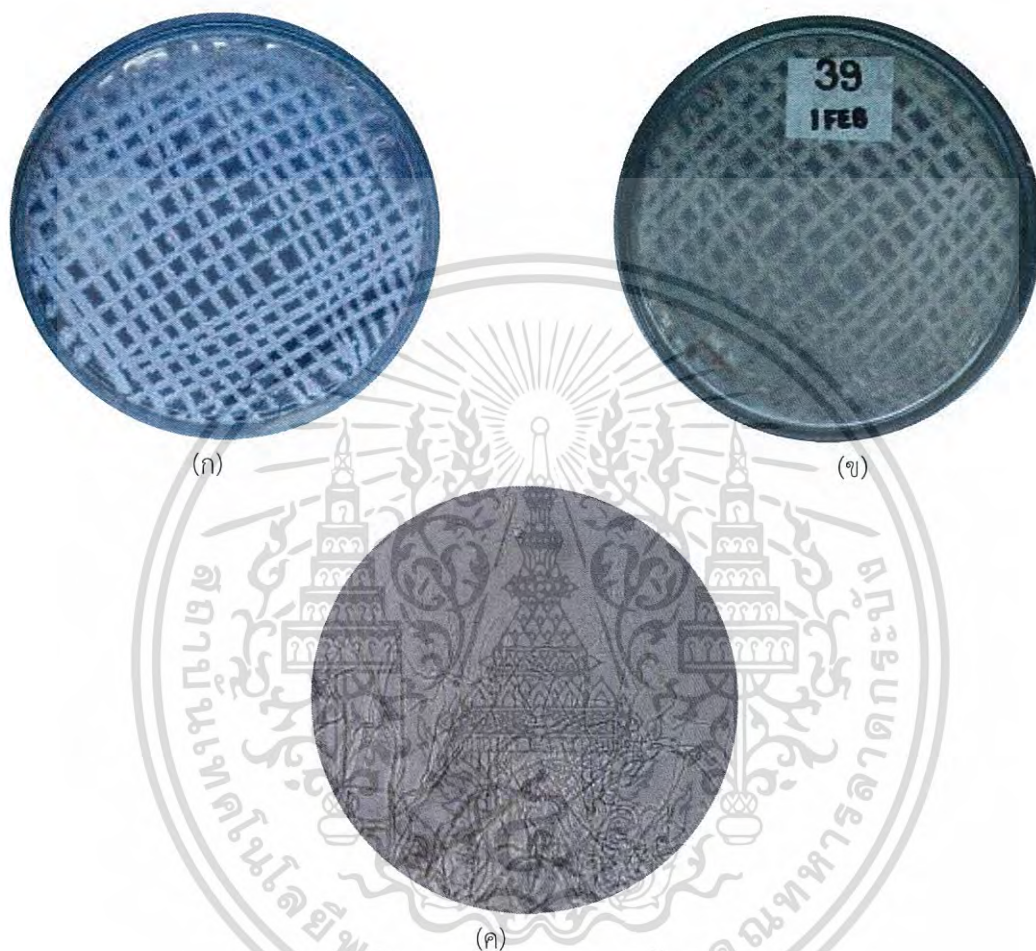
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 38 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 38 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 39 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Purplish Gray และ substrate mycelium สี Dark Reddish Purple ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 39

- (ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 39 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 39 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 43 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Yellow และ substrate mycelium สี Brilliant Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์ทรงกลมต่อกันเป็นเส้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 43

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 43 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 43 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 44 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Gray และ substrate mycelium สี Pale Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International Streptomyces Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 44

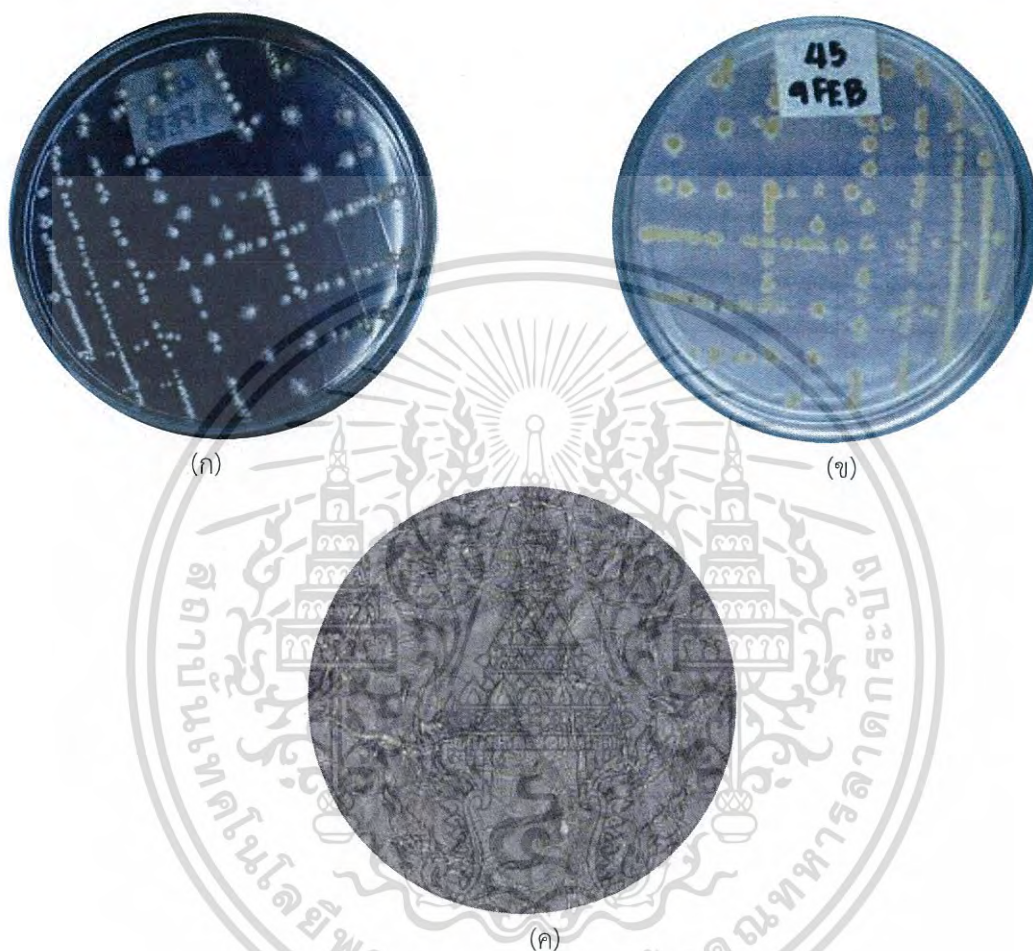
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 44 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 44 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 45 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Orange Yellow และ substrate mycelium สี Brilliant Orange ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 45

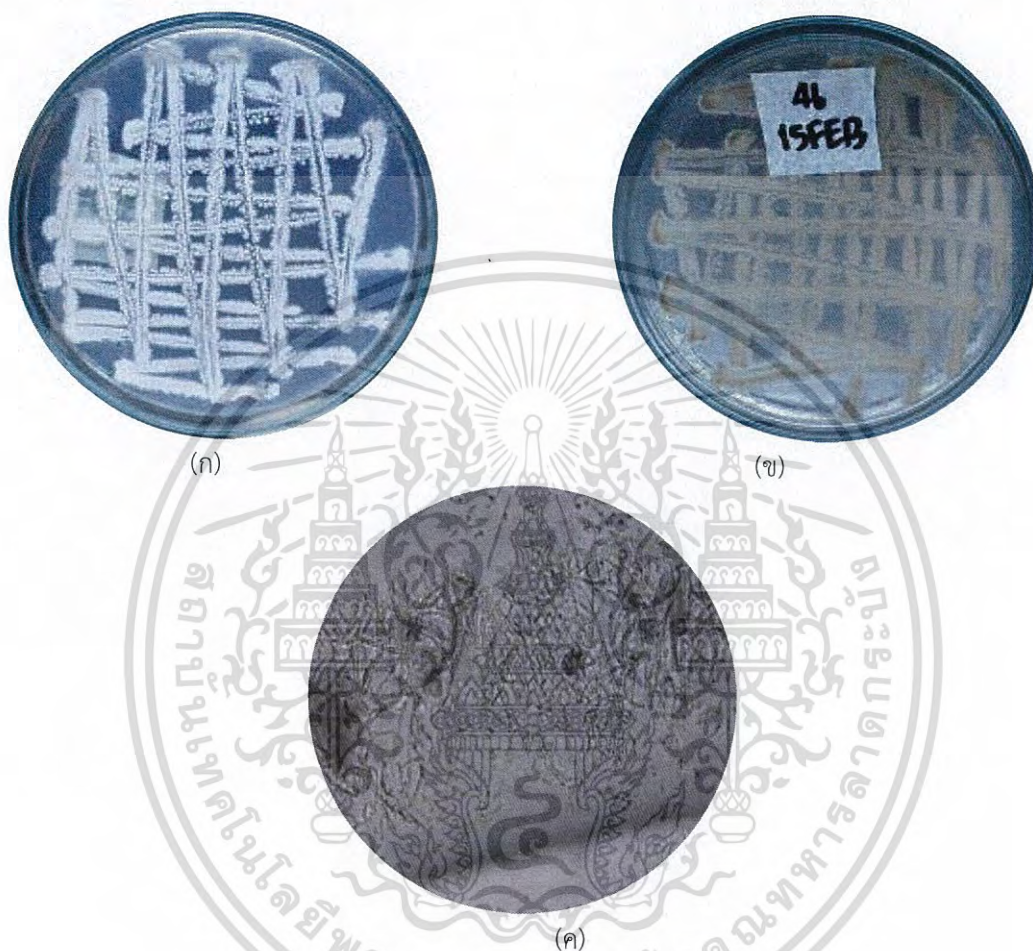
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 45 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 45 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 46 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Pink และ substrate mycelium สี Light Yellowish Pink ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 46

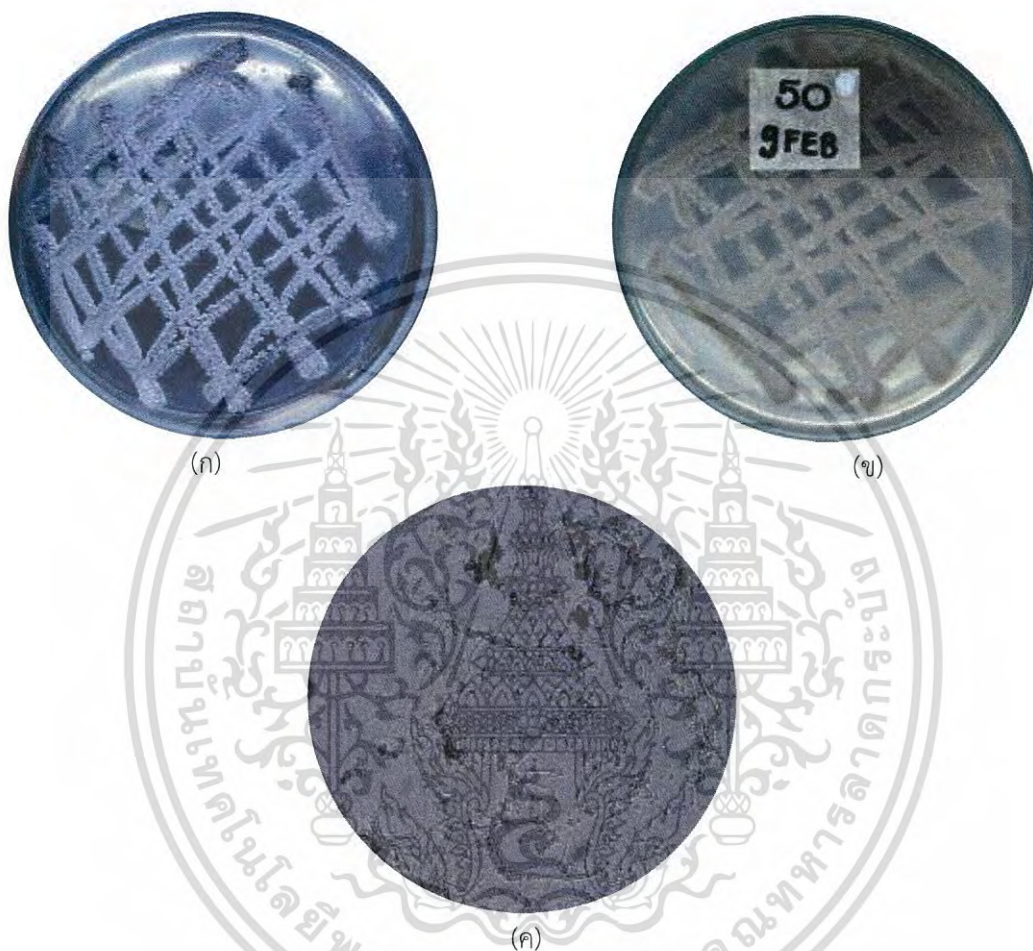
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 46 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลิน FAJ 46 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 50 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Light Purplish Gray และ substrate mycelium สี Light Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International Streptomyces Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 50

- (ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 50 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium เชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 50 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 51 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish White และ substrate mycelium สี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 51

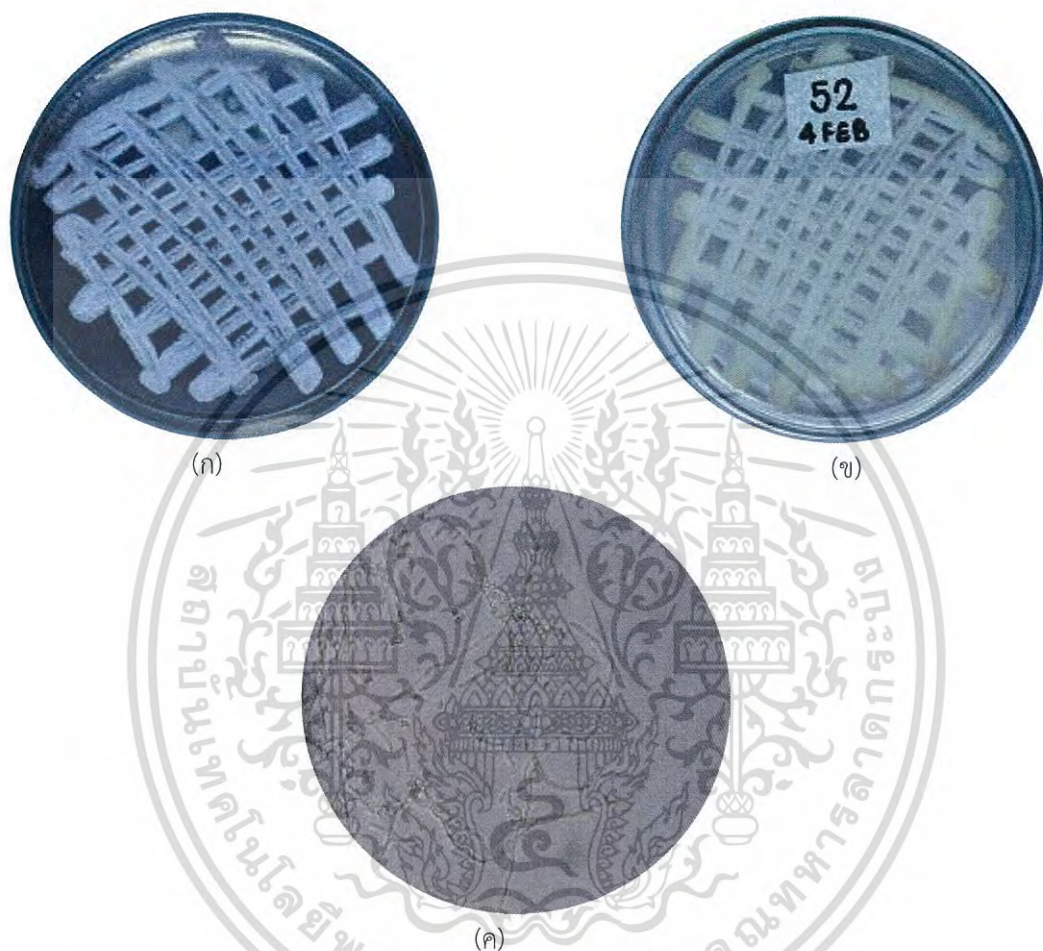
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 51 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 51 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 52 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pale Greenish Yellow และ substrate mycelium สี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์ทรงกลมต่อกันเป็นเส้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 52

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 52 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 52 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคคตินอมัยซีทไอโซเลท FAJ 53 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Pinkish White และ substrate mycelium สี Grayish Pink ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคคตินอมัยซีทไอโซเลท FAJ 53

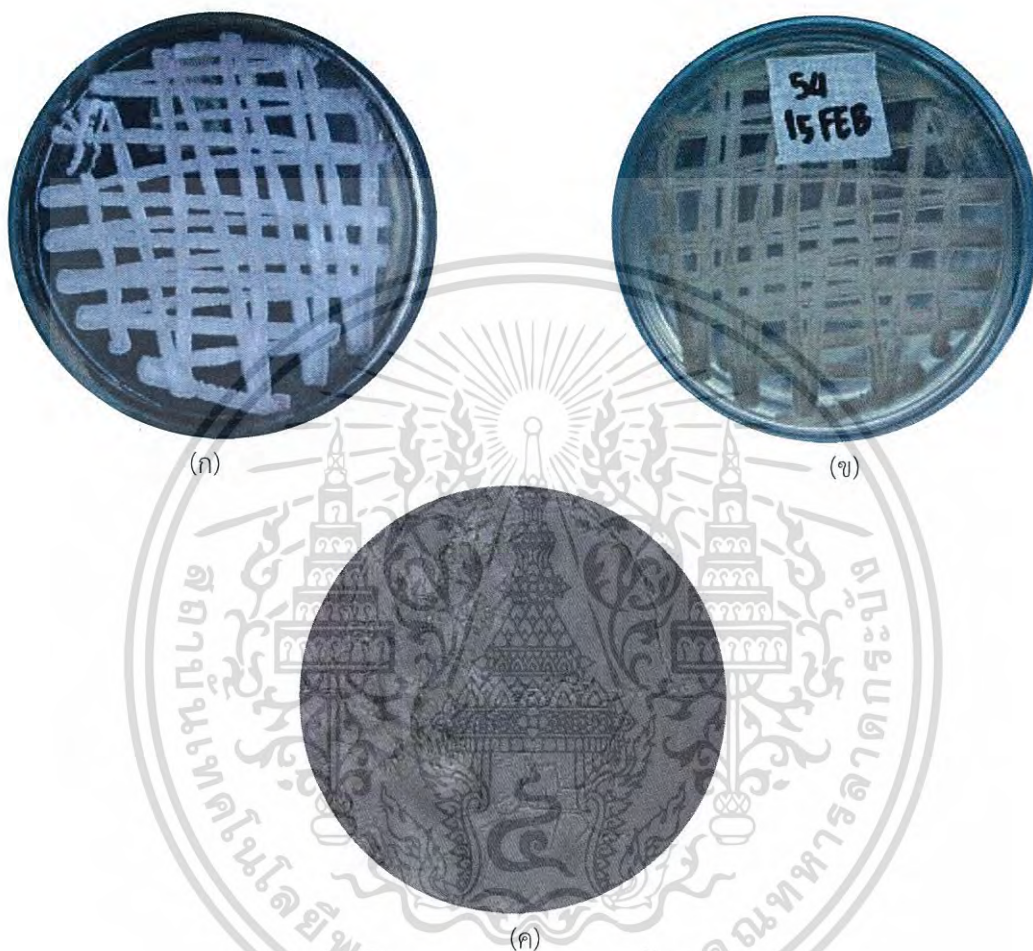
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคคตินอมัยซีทไอโซเลท FAJ 53 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคคตินอมัยซีทไอโซเลท FAJ 53 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 54 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish White และ substrate mycelium สี Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 54

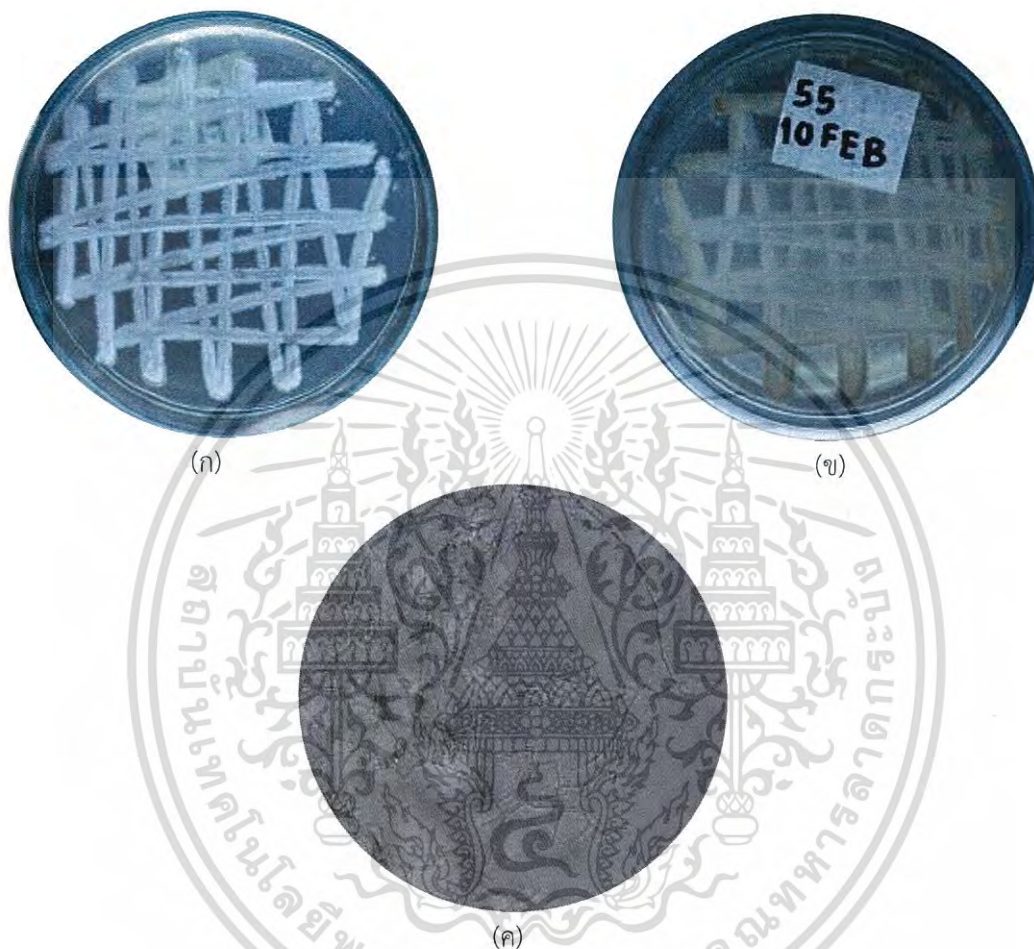
(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 54 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 54 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 55 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี White และ substrate mycelium สี Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International *Streptomyces* Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 55

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 55 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท FAJ 55 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 56 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Starch - casein agar (SCA) สร้าง aerial mycelium สี Yellowish White และ substrate mycelium สี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายสั้นบนอาหาร International Streptomyces Project agar (ISP2)



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 56

(ก) แสดงลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 56 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินไอโซเลท FAJ 56 บนอาหาร Starch - casein agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 ชีวเคมีบางประการของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท

ในการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ณ ตำบลบางปู อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ มีการศึกษาทั้งหมด 5 การทดสอบ คือ

4.2.2.1 การทดสอบการตกตะกอนในหลอดอาหาร Skim milk 10% ถ้าหากเกิดการตกตะกอนของโปรตีนจะเกิดตะกอนในน้ำนมบริเวณก้นหลอด โดยเทียบกับชุดควบคุม (control)

4.2.2.2 การย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar ถ้าเกิดการย่อยสลายโปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นสีใส

4.2.2.3 การย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth ถ้าเกิดการย่อยสลายของเจลาติน จะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4.2.2.4 การย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth การตรวจผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกและสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine ถ้าเชื้อแอกติโนมัยซีทสามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร หลังจากหยดสารละลายทดสอบลงไป

4.2.2.5 การทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salts-starch agar ทำการตรวจผลโดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลงบนอาหาร ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้น จะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท

หมายเลข ไอโซเลท	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
	Coagulation	Peptonization			
FAJ 3	-	-	-	-	-
FAJ 5	+	+	-	+	-
FAJ 6	+	-	-	-	-
FAJ 7	+	-	-	+	-
FAJ 8	+	-	-	+	+
FAJ 9	+	-	+	-	+
FAJ 11	+	-	+	-	-
FAJ 13	+	+	-	-	+
FAJ 14	+	+	-	+	+
FAJ 15	+	-	-	+	-
FAJ 16	+	-	-	-	-
FAJ 31	+	-	+	+	+
FAJ 33	+	+	-	-	-
FAJ 34	+	-	-	-	+
FAJ 36	+	+	-	-	+
FAJ 37	+	+	-	-	-
FAJ 38	-	-	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 29 ไอโซเลท (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลท	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
	Coagulation	Peptonization			
FAJ 39	-	-	+	+	-
FAJ 43	+	+	-	-	+
FAJ 44	+	-	-	-	-
FAJ 45	+	+	-	-	-
FAJ 46	+	+	-	-	-
FAJ 50	+	-	-	-	+
FAJ 51	+	-	-	-	+
FAJ 52	+	-	+	-	+
FAJ 53	+	-	+	-	+
FAJ 54	+	-	-	-	+
FAJ 55	+	-	-	+	+
FAJ 56	-	-	+	-	-

หมายเหตุ

- + หมายถึง เกิดปฏิกิริยา
- หมายถึง ไม่เกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2), (Control) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสกีโนมัยซีท

ผลการเจริญของการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสกีโนมัยซีทในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแอสกีโนมัยซีทแต่ละไอโซเลท โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8 เลือกมา 1 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้มากที่สุดเพื่อทำการทดลองในชุดถัดไป

การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่เลือกมา 1 ไอโซเลท ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกันคือ 5, 6, 7, 8 และ 9

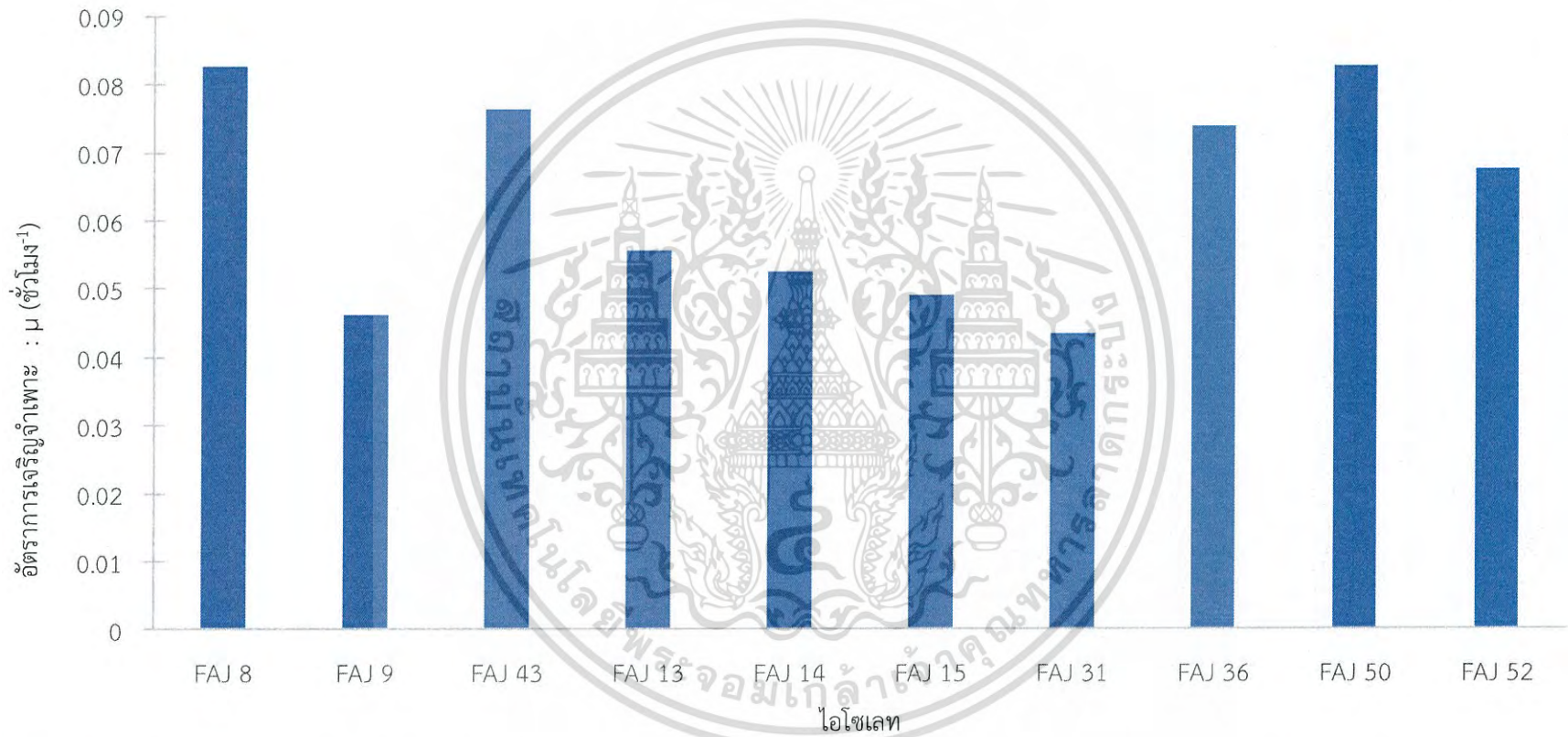
การทดลองที่ 3 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีท เลือกมา 1 ไอโซเลท ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีท เลือกมา 1 ไอโซเลท ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

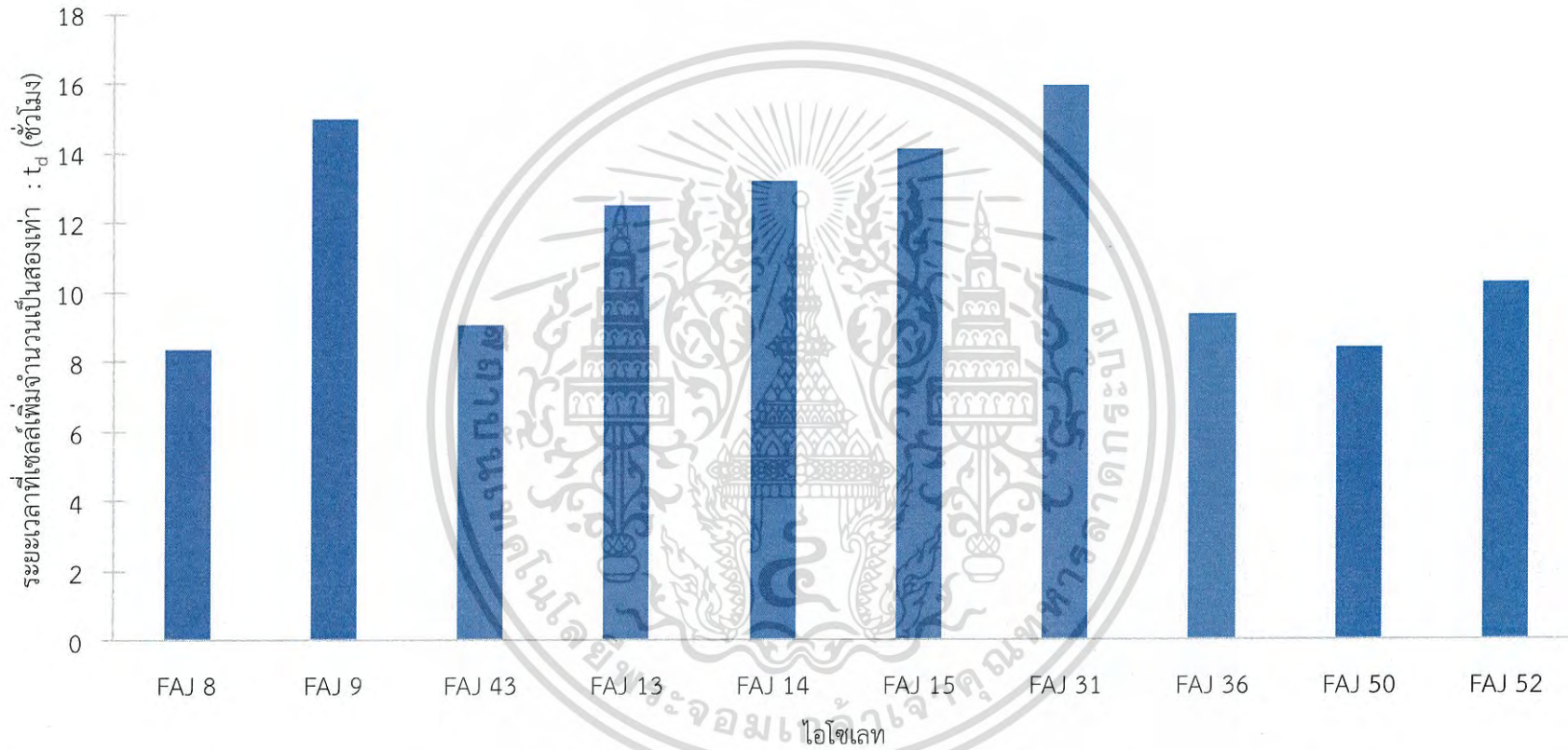
ในการศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสกีโนมัยซีทแต่ละชุดการทดลอง สามารถทำได้โดยการวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง, อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ), ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) และวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึม

ตารางที่ 4.3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 10 ไอโซเลท จากการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8

ไอโซเลท	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
FAJ 8	15-27	0.0828	8.3696
FAJ 9	12-27	0.0462	15.0032
FAJ 43	9-21	0.0764	9.0707
FAJ 13	15-27	0.0555	12.4965
FAJ 14	15-27	0.0524	13.2252
FAJ 15	15-30	0.0490	14.1429
FAJ 31	15-27	0.0434	15.9677
FAJ 36	15-24	0.0739	9.3775
FAJ 50	19-27	0.0827	8.3797
FAJ 52	18-24	0.0676	10.2515



รูปที่ 4.30 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) ของเชื้อแอสทีโนมายซีที 10 ไอโซเลท การทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8



รูปที่ 4.31 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า :  $t_d$  (ชั่วโมง) ของเชื้อแอกติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท การทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH



รูปที่ 4.32 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8



รูปที่ 4.33 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 9 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.34 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 43 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8



รูปที่ 4.35 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 14 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8



รูปที่ 4.37 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 31 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8



รูปที่ 4.39 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 36 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ไอโซเลท FAJ 50

รูปที่ 4.40 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 50 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8



ไอโซเลท FAJ 52

รูปที่ 4.41 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 52 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP4 pH8

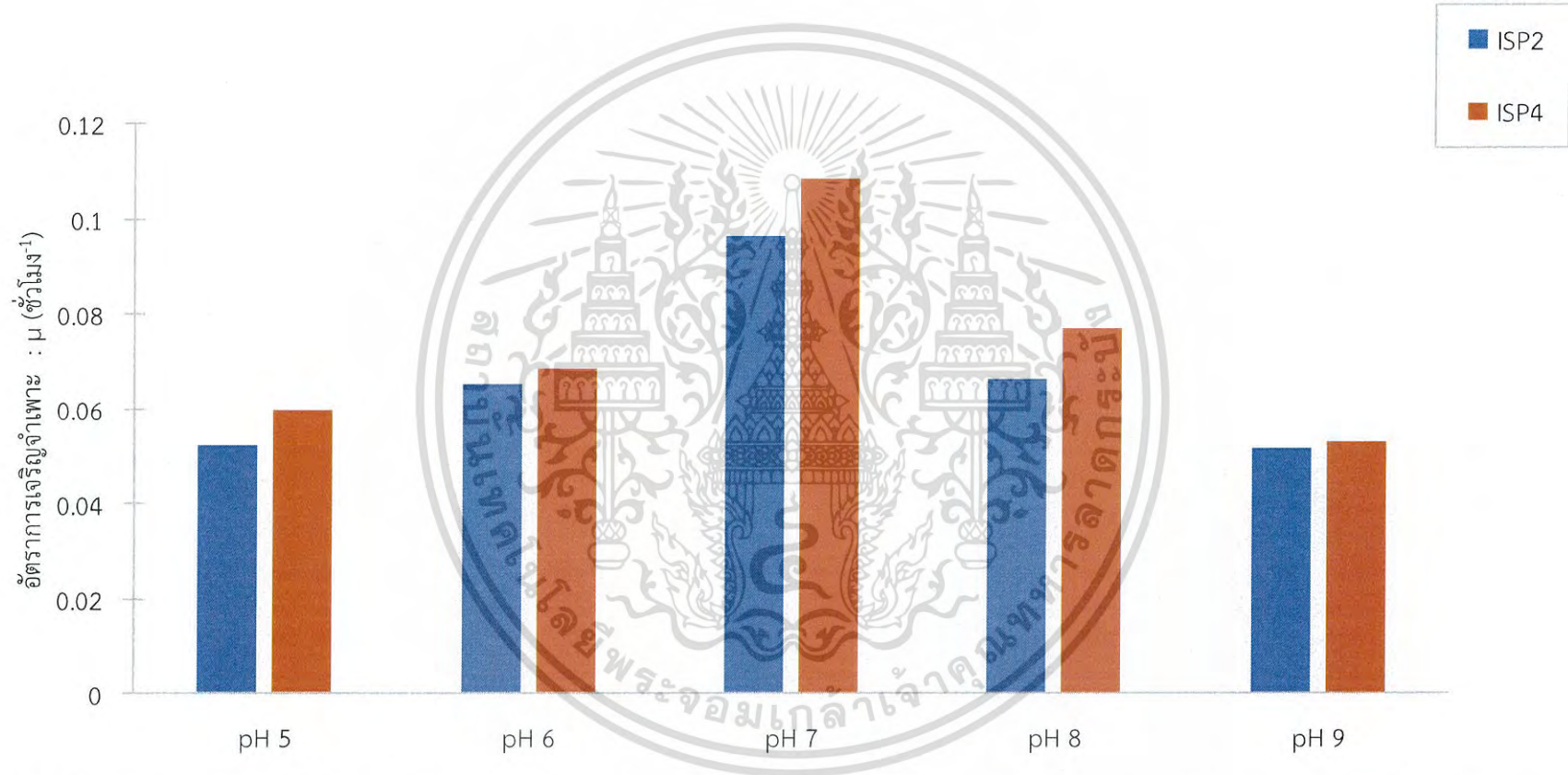
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ไฮโซเลท FAU 8 จากการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9

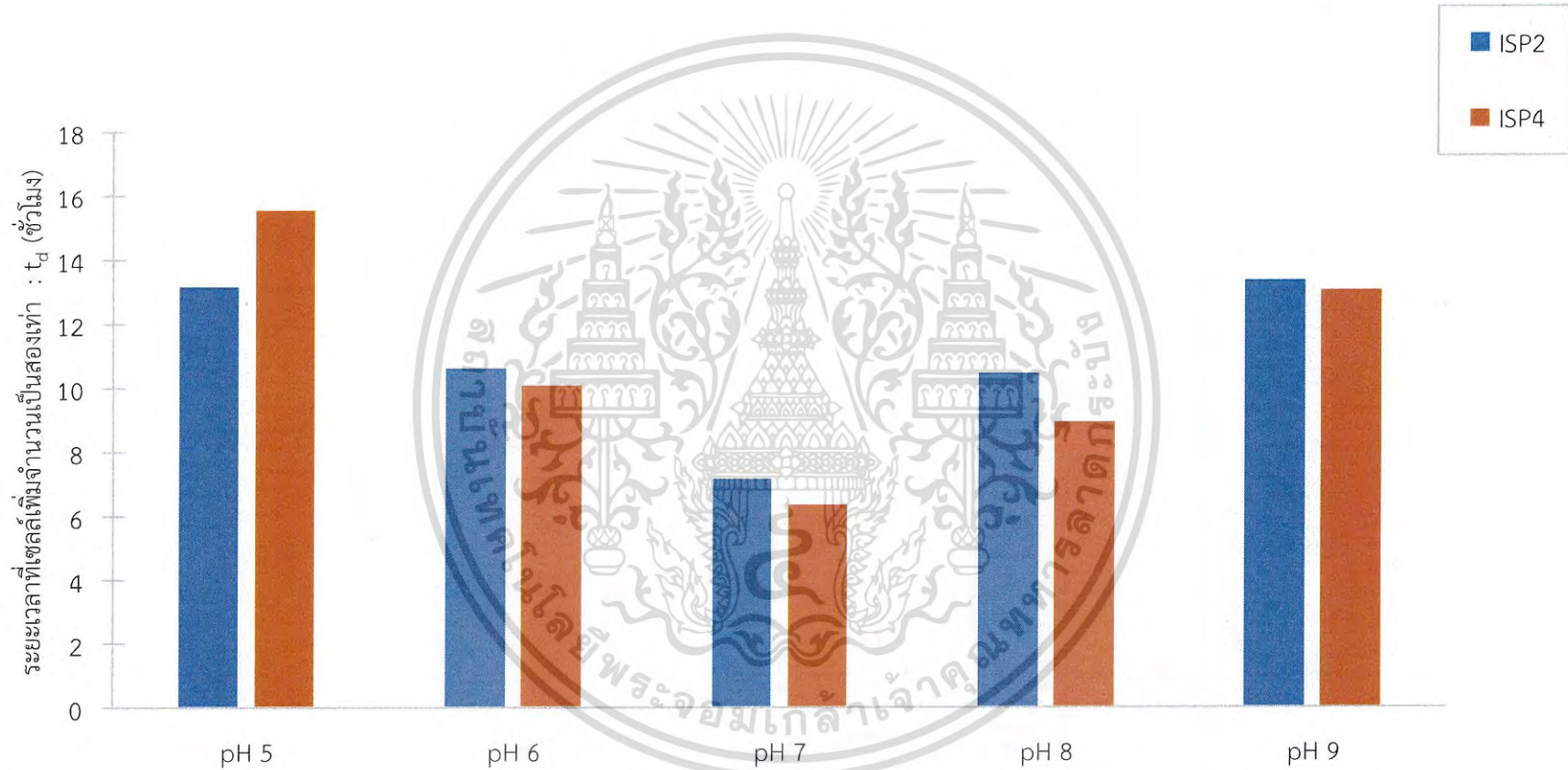
ISP2	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
pH5	12-27	0.0525	13.2000
pH6	15-27	0.0651	10.6452
pH7	15-27	0.0964	7.1888
pH8	15-27	0.0662	10.4683
pH9	12-24	0.0518	13.3784

ตารางที่ 4.5 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9

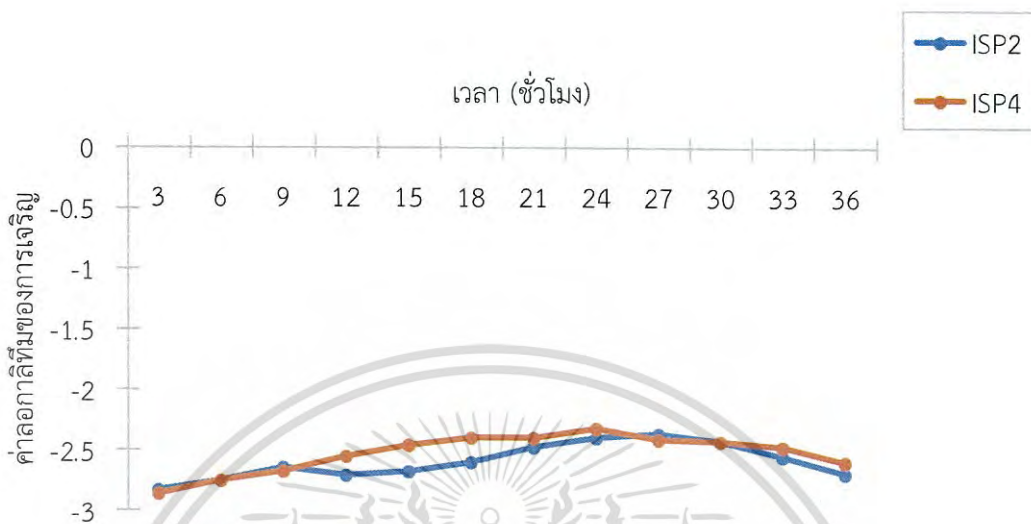
ISP4	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
pH5	9-24	0.0599	15.5693
pH6	12-27	0.0686	10.1020
pH7	15-27	0.1086	6.3812
pH8	12-27	0.0771	8.9883
pH9	15-27	0.0530	13.0755



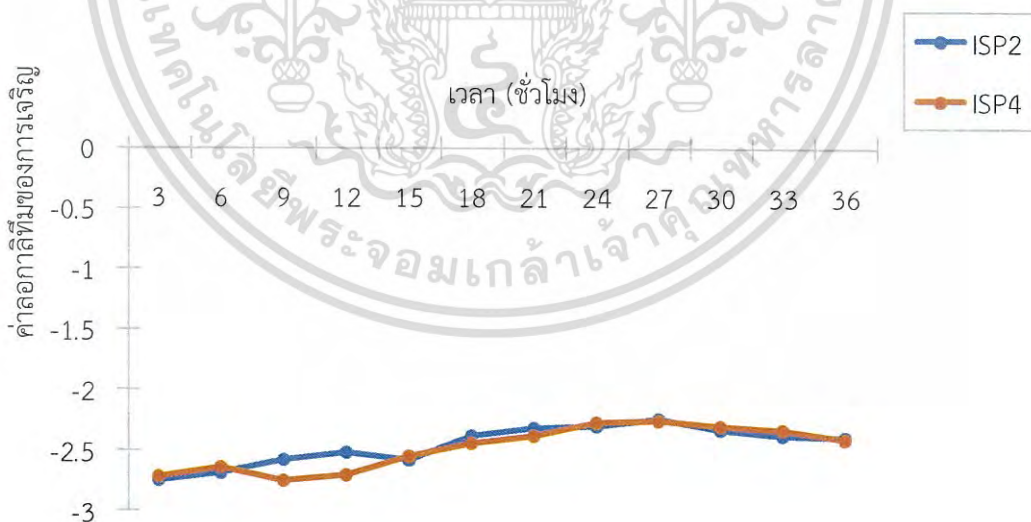
รูปที่ 4.42 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทีโอโซเลท FAJ8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9



รูปที่ 4.43 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า :  $t_d$  (ชั่วโมง) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9

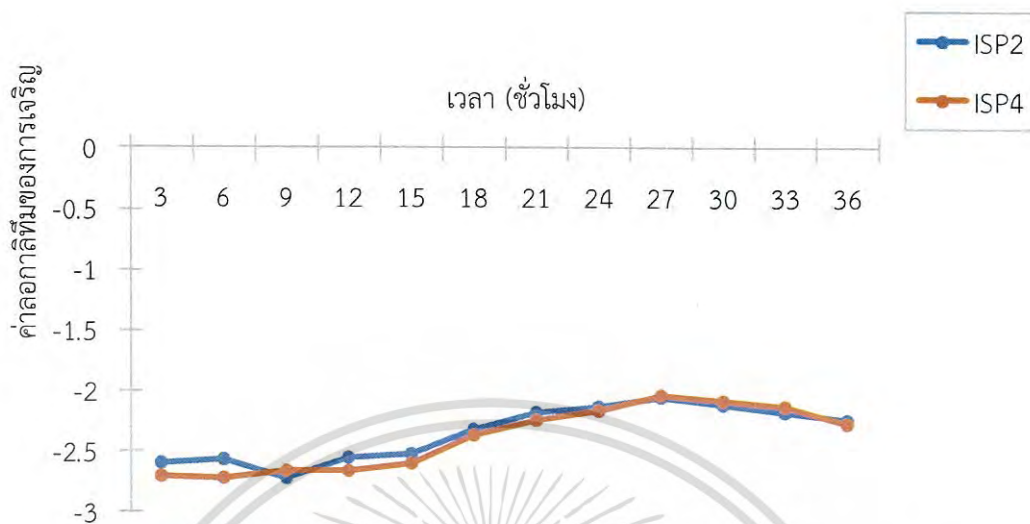


รูปที่ 4.44 แสดงค่าลดทอนการเจริญของเชื้อแอสโตโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 5

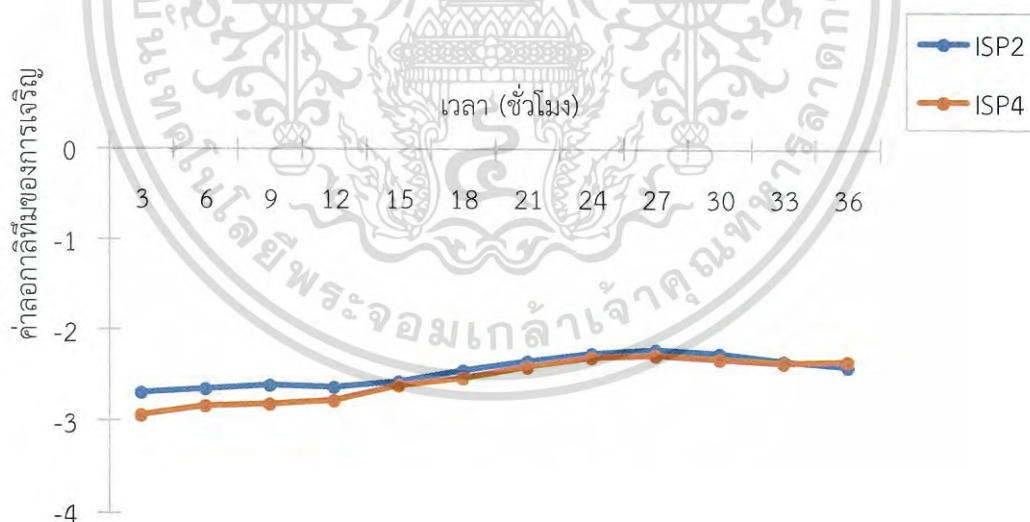


รูปที่ 4.45 แสดงค่าลดทอนการเจริญของเชื้อแอสโตโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

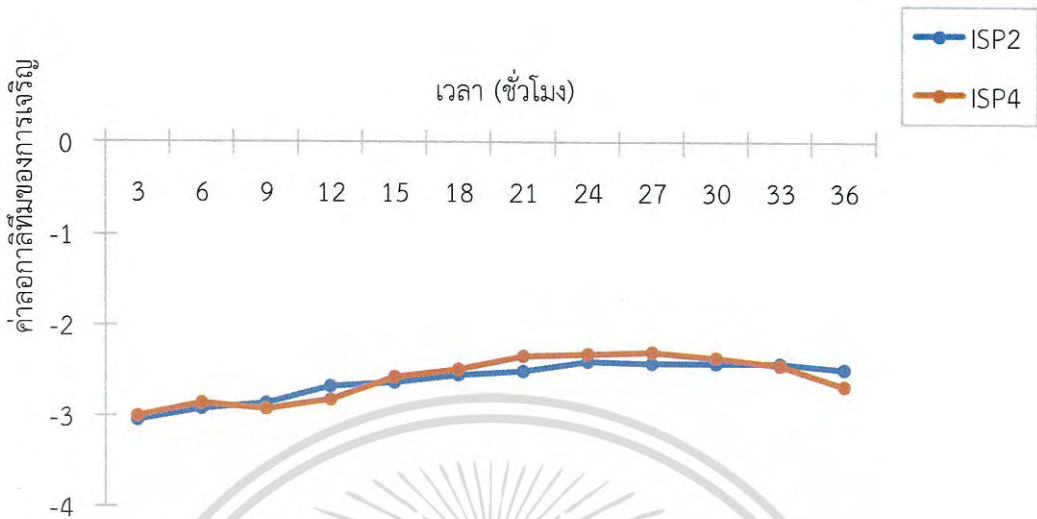


รูปที่ 4.46 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 7



รูปที่ 4.47 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.48 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสโตโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 9

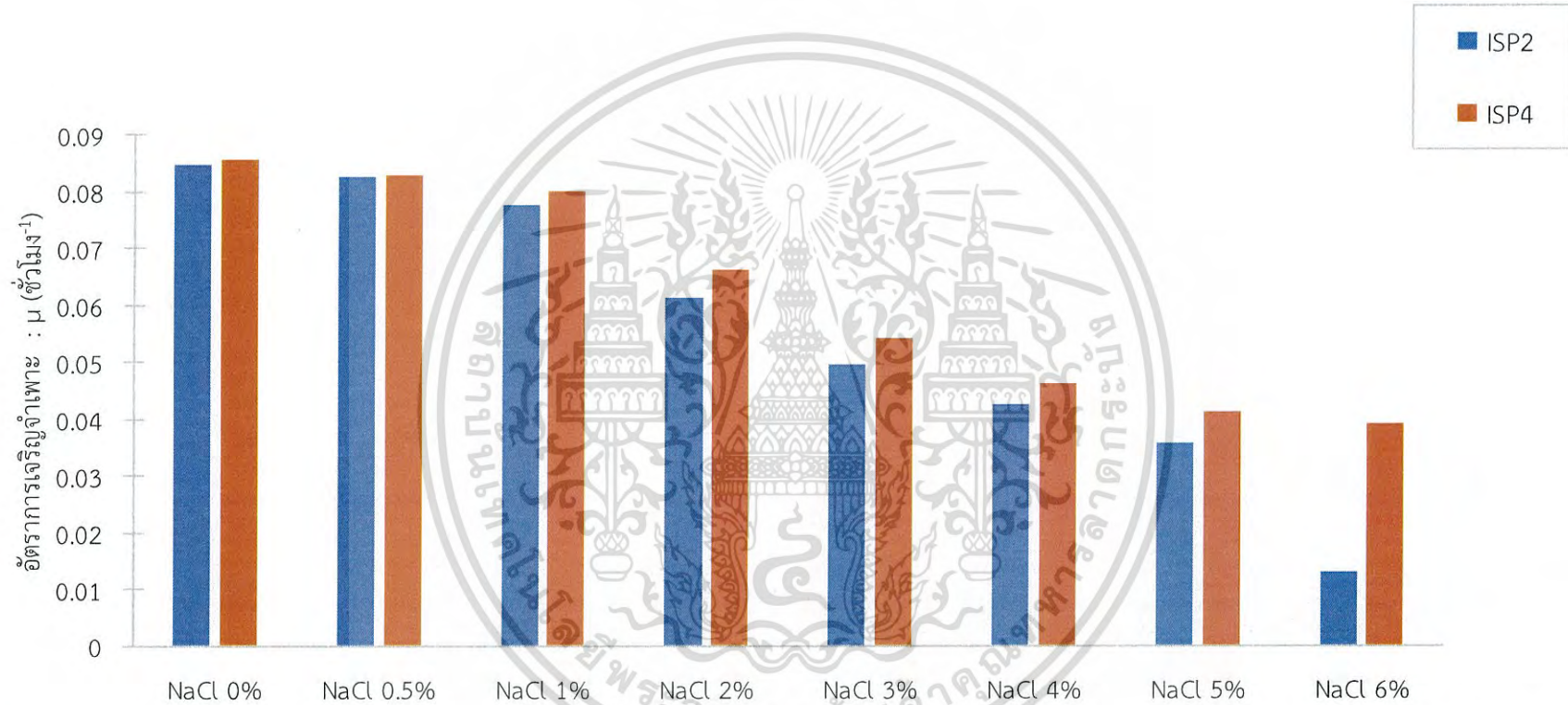
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%

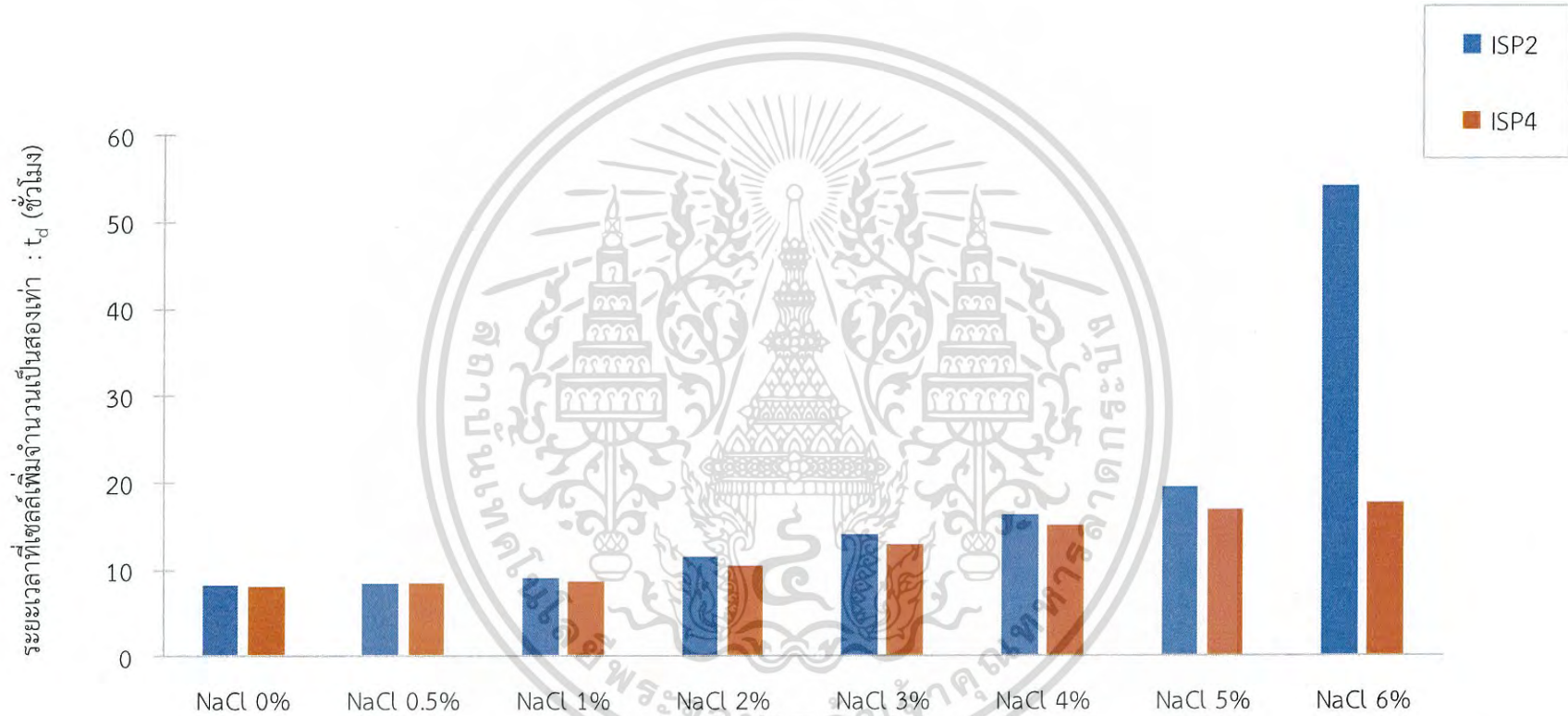
ISP2	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
NaCl 0%	9-24	0.0847	8.1818
NaCl 0.5%	12-27	0.0826	8.3898
NaCl 1%	12-24	0.0777	8.9189
NaCl 2%	12-24	0.0612	11.3235
NaCl 3%	9-24	0.0496	13.9718
NaCl 4%	9-27	0.0426	16.2676
NaCl 5%	15-27	0.0356	19.4663
NaCl 6%	12-24	0.0128	54.1406

ตารางที่ 4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไฮโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%

ISP4	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
NaCl 0%	9-24	0.0857	8.0863
NaCl 0.5%	12-24	0.0828	8.3696
NaCl 1%	12-27	0.0800	8.6625
NaCl 2%	12-27	0.0662	10.4683
NaCl 3%	12-27	0.0541	12.8096
NaCl 4%	12-27	0.0462	15.0000
NaCl 5%	12-27	0.0413	16.7797
NaCl 6%	12-27	0.0392	17.6786



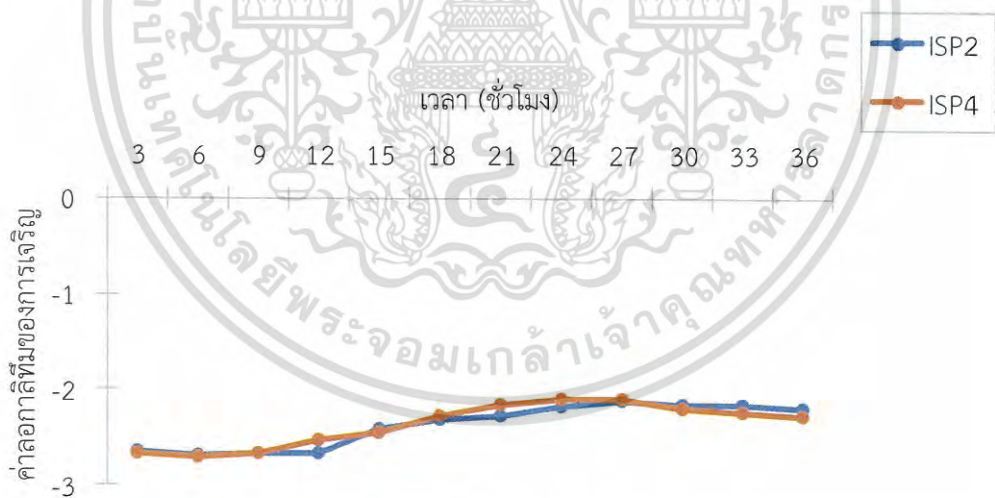
รูปที่ 4.49 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) ของเชื้อแอสโตโนมัยซีทีไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%



รูปที่ 4.50 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า : t<sub>d</sub> (ชั่วโมง) ของเชื้อแอสคิตินิมัยซีที่ไอโซเลท FAU 8 การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6%

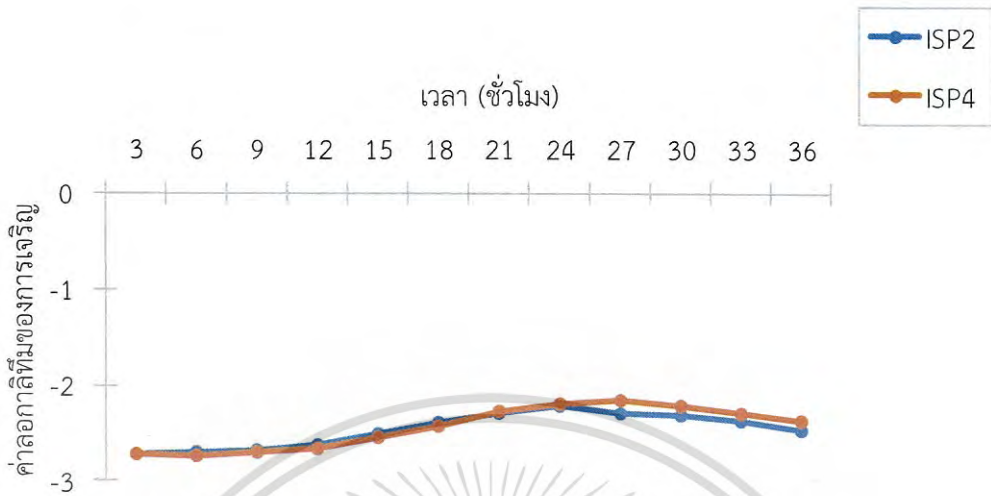


รูปที่ 4.51 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 0%

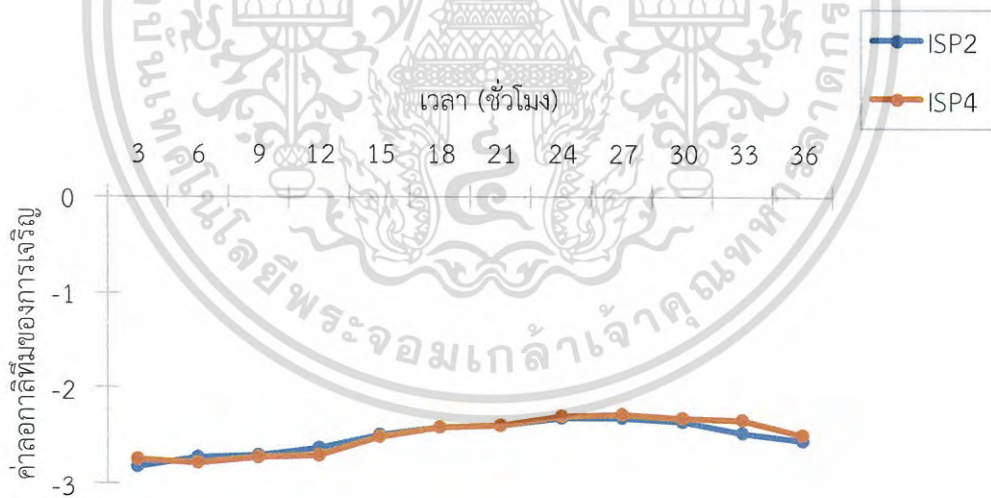


รูปที่ 4.52 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 0.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

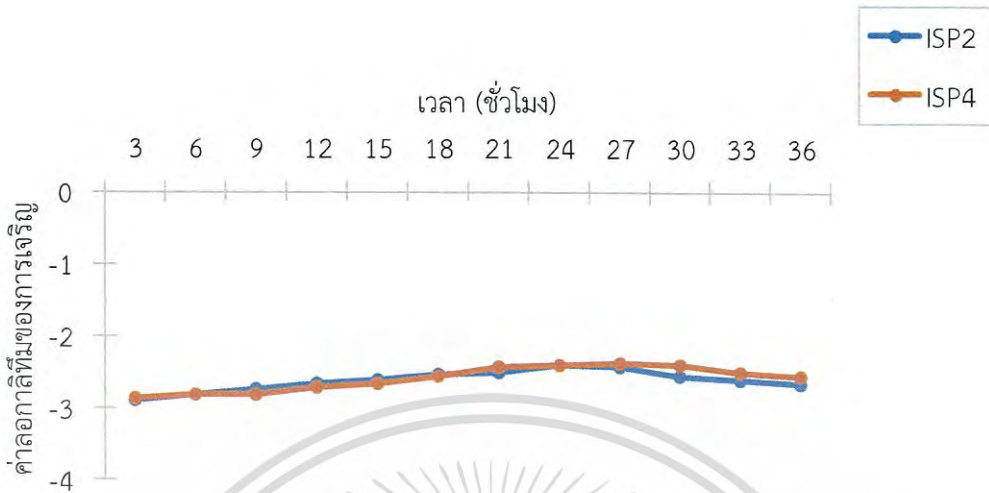


รูปที่ 4.53 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 1%

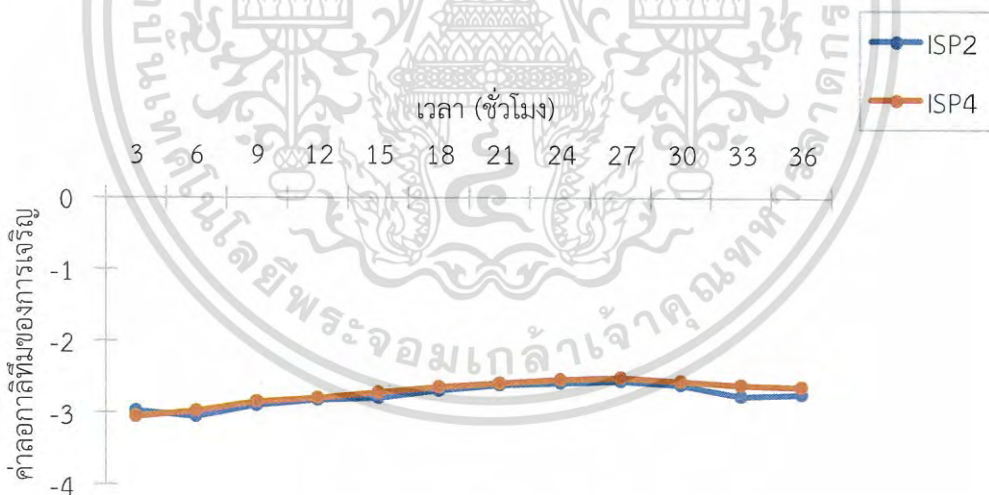


รูปที่ 4.54 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

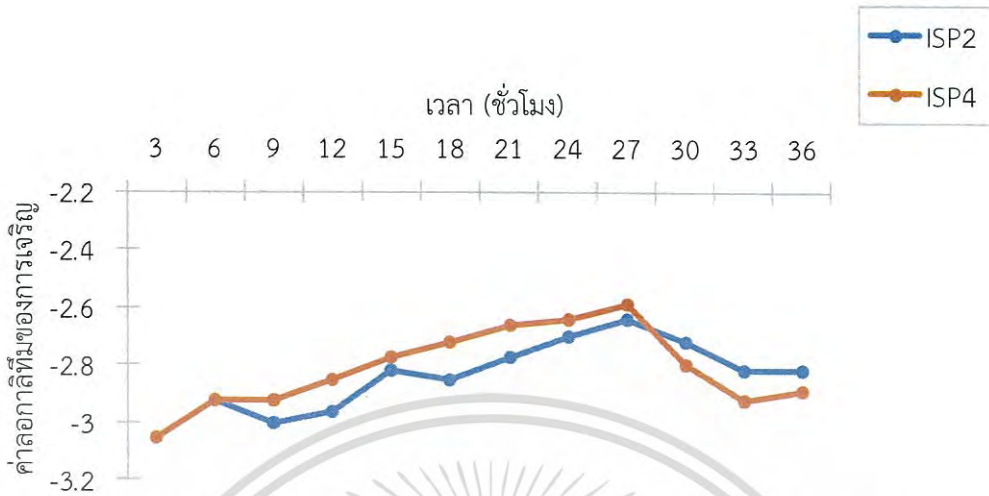


รูปที่ 4.55 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAU 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 3%

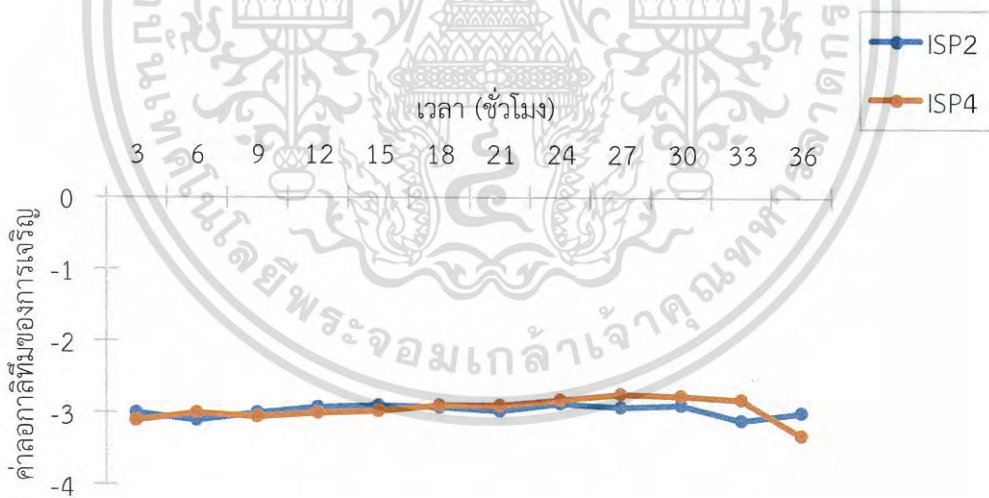


รูปที่ 4.56 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAU 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.57 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 5%



รูปที่ 4.58 แสดงค่าลอการิทึมการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ความเข้มข้น NaCl 6%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีทีไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

ISP2	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
20 °C	15-27	0.0584	11.8664
30 °C	12-27	0.0823	8.3293
37 °C	12-27	0.0732	9.4672
45 °C	12-27	0.0698	9.9284

ตารางที่ 4.9 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 จากการทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

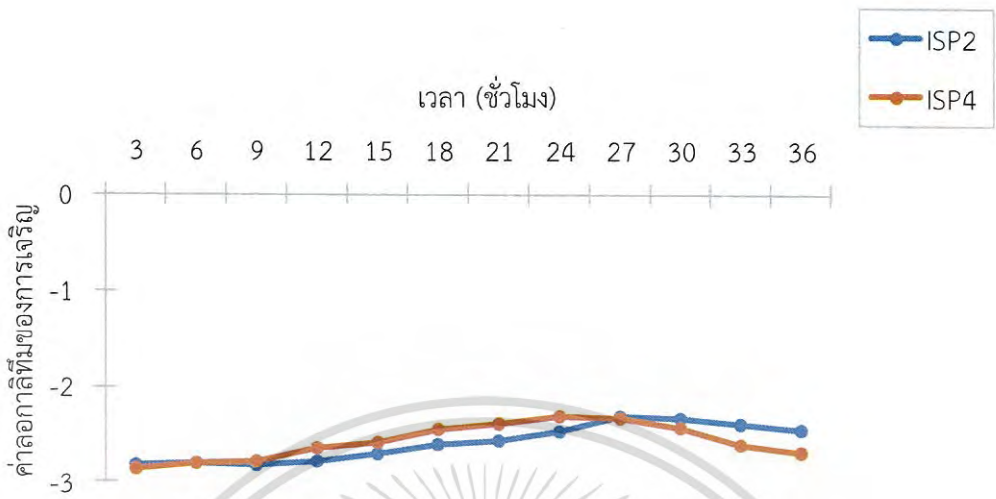
ISP4	range of date	Specific growth rate ( $\mu$ )	Doubling time ( $t_d$ )
20 °C	12-24	0.0630	11.0000
30 °C	12-27	0.0866	8.0023
37 °C	12-27	0.0790	8.7722
45 °C	9-24	0.0712	9.7331



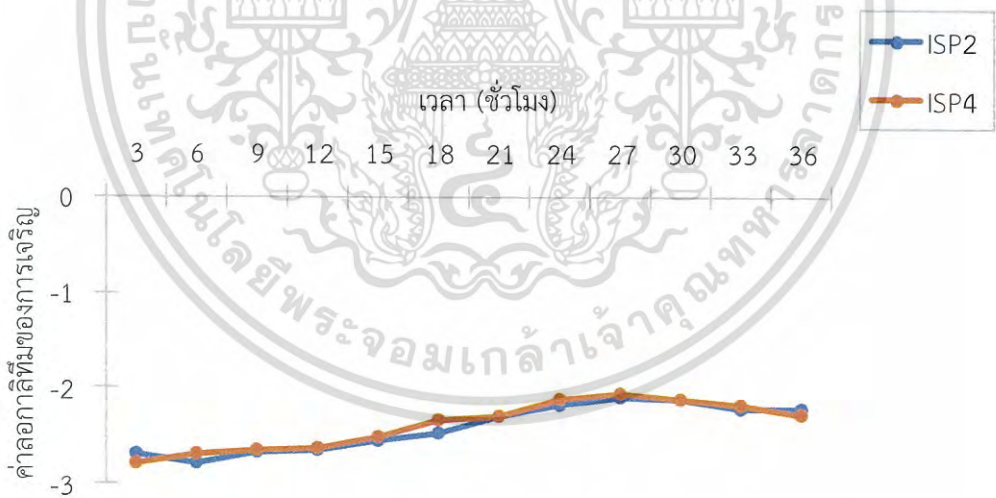
รูปที่ 4.59 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate :  $\mu$ ) ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 4 โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.60 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า :  $t_d$  (ชั่วโมง) ของเครือข่ายคอมพิวเตอร์ไอโซเลท FAJ 8 การทดลองที่ 4 โดยเฉพาะเสียงอุณหภูมิต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส

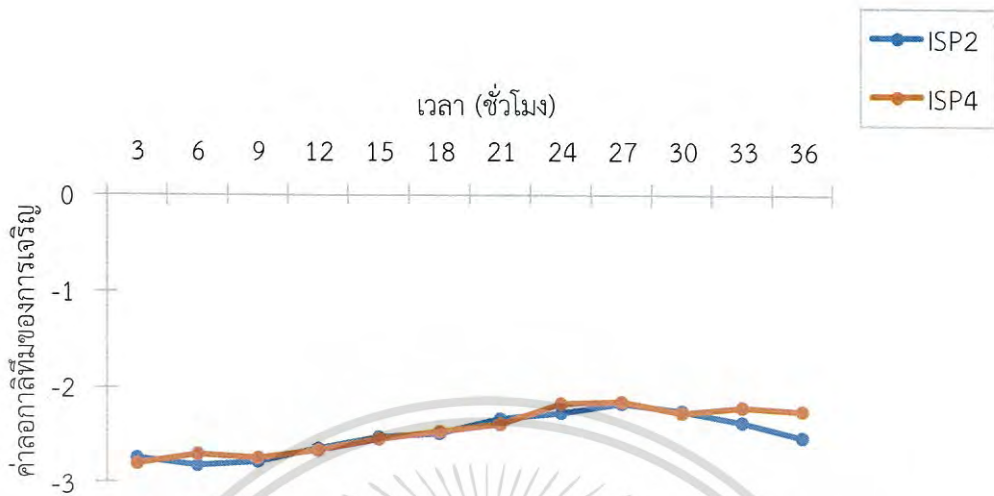


รูปที่ 4.61 แสดงค่าลอกการีทิมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

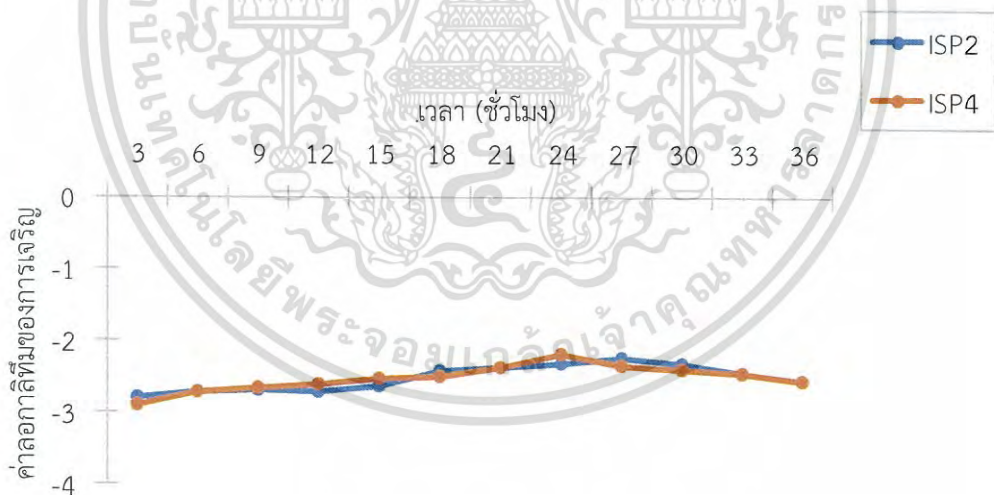


รูปที่ 4.62 แสดงค่าลอกการีทิมการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.63 แสดงค่าลดการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

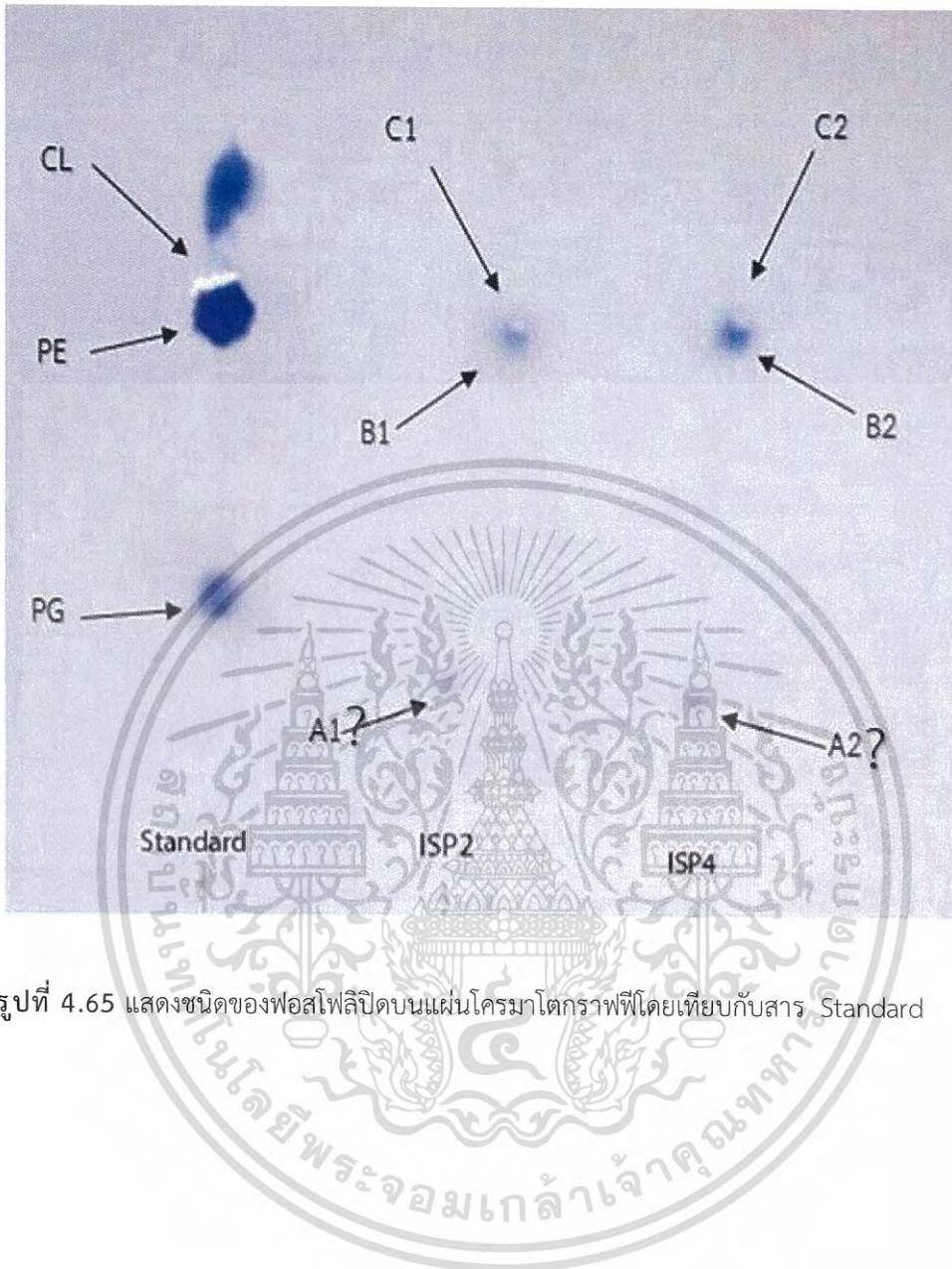


รูปที่ 4.64 แสดงค่าลดการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

Phospholipid เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ Phospholipid แสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ และบริเวณที่ชอบน้ำในโมเลกุล (Lechevalier *et al.*, 1997) ในการศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยใช้เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท 8 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) broth ที่ระดับ pH8 แล้วทำการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว Yeast extract – malt extract (YEME) แล้วนำมาเลี้ยงเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายสปอร์ลงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH7 นำไปปั่นเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการศึกษาว่าจะเกิดการสร้างฟอสโฟลิปิดที่แตกต่างกันอย่างไร โดยฟอสโฟลิปิดจะแยกโดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) และนำมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ หรือค่า Rf (rate of flow) โดย phospholipids standard ที่ใช้มี 3 ชนิดได้แก่ L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt (PG), 3-sn Phosphatidylethanolamine (PE), และ Cardiolipin sodium salt (CL) เมื่อหึ่งให้สารละลายตัวพาวิ่งขึ้นไปประมาณ 4 ใน 5 แล้วนำมาคำนวณหาค่า Rf



รูปที่ 4.65 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีโดยเทียบกับสาร Standard

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค thin layer chromatography และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8

ไอโซเลท 8	ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบ						น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม) จาก น้ำหนักเซลล์เปียก 100 มิลลิกรัม
	phosphatidylglycerol (PG)		phosphatidylethanolamine (PE)		cardiolipin (CL)		
	ตำแหน่งใน chromatograph	ค่า R <sub>f</sub>	ตำแหน่งใน chromatograph	ค่า R <sub>f</sub>	ตำแหน่งใน chromatograph	ค่า R <sub>f</sub>	
Standard	PG	0.40	PE	0.72	CL	0.92	-
ISP2	-	-	B1	0.69	C1	0.91	23.4
ISP4	-	-	B2	0.70	C2	0.89	68.9

## 4.5 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน

### 4.5.1 การหาน้ำหนักดิน

นำตัวอย่างดินที่ความเจือจางที่  $10^{-1}$  จากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 จุด ใส่ในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำระเหยแห้งจนหมด และดินมีน้ำหนักคงที่ (ดังวิธีการทดลอง 7.1) จากนั้น คำนวณหาน้ำหนักของดินหลังอบที่หายไป (ภาคผนวก ข )

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง  $10^{-1}$  หลังอบ

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนักบีก เกอร์ (g)	น้ำหนักสาร แขวนลอย ของดินที่ ความเจือจาง $10^{-1}$ ก่อนอบ (g)	น้ำหนักบีกเกอร์ กับน้ำหนักสาร แขวนลอยของ ดินที่ความเจือ จาง $10^{-1}$ ก่อน อบ (g)	น้ำหนักบีก เกอร์กับ น้ำหนักสาร แขวนลอยของ ดินที่ความเจือ จาง $10^{-1}$ หลัง อบ (g)	น้ำหนักสาร แขวนลอยของ ดินที่ความเจือ จาง $10^{-1}$ ก่อน อบ (g)
1	28.264	8.365	36.629	28.766	0.502
2	30.392	8.900	39.292	30.808	0.416
3	29.561	7.290	36.851	30.340	0.779
4	29.374	7.199	36.573	30.226	0.852
5	31.693	7.811	39.504	32.596	0.903
6	30.112	8.314	38.426	30.647	0.535
7	28.660	8.502	37.162	29.472	0.812
8	28.442	8.904	37.346	28.842	0.400
9	29.306	8.707	38.013	29.995	0.689
10	29.211	9.230	38.441	29.782	0.571

#### 4.5.2 การหาปริมาณความชื้น

ซึ่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักของดินคงที่ (ตั้งวิธีการทดลอง 7.2) จากนั้นคำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป (ภาคผนวก ข )

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินจากน้ำหนักของดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักดินคงที่

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม)	น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (%)
จุดที่ 1	27.760	1.985	28.752	0.992	0.993	50.03 %
จุดที่ 2	28.177	1.992	29.051	0.874	1.118	56.12 %
จุดที่ 3	28.072	1.998	28.971	0.899	1.099	55.01 %
จุดที่ 4	29.017	1.988	29.929	0.912	1.076	54.12 %
จุดที่ 5	28.787	1.996	29.710	0.923	1.073	53.76 %
จุดที่ 6	29.354	2.004	30.300	0.946	1.058	52.79 %
จุดที่ 7	29.702	1.991	30.558	0.856	1.135	57.01 %
จุดที่ 8	29.342	1.890	30.252	0.910	0.980	51.85 %
จุดที่ 9	29.164	1.986	30.130	0.966	1.020	51.36 %
จุดที่ 10	28.583	1.856	29.568	0.985	0.871	46.93 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6.3 การวัดค่าความเป็นกรด-เบส

ซึ่งตัวอย่างดินมาประมาณ 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วย จนกระทั่งสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บริเวณบนผิวหน้า (ดังวิธีการทดลอง 7.3) ทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) โดยจะต้องทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบสซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ค่าความเป็นกรด-เบส			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
จุดที่ 1	2.114	5.50	5.52	5.53	5.52
จุดที่ 2	1.975	6.29	6.31	6.29	6.30
จุดที่ 3	1.890	7.29	7.28	7.26	7.28
จุดที่ 4	2.027	7.10	7.09	7.08	7.09
จุดที่ 5	2.220	7.15	7.13	7.14	7.14
จุดที่ 6	2.162	7.14	7.15	7.17	7.15
จุดที่ 7	1.813	7.23	7.22	7.24	7.23
จุดที่ 8	1.931	7.19	7.18	7.20	7.19
จุดที่ 9	2.048	7.35	7.31	7.32	7.33
จุดที่ 10	2.110	7.26	7.23	7.22	7.24

จากการศึกษาและทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนธรรมชาติ ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมดจำนวน 29 ไอโซเลท และทำการแบ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีทออกเป็น 10 กลุ่ม โดยแบ่งตามสีของ aerial mycelium เมื่อเทียบกับระบบสี NBS/ISCC จากนั้นจึงเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบความสามารถการเจริญในอาหารที่สภาวะต่างๆโดยเลือกไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้ มาทำการทดสอบหาความสามารถของการเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยใช้อาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) เป็น control ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น Malt extract เปรียบเทียบกับ อาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็น Soluble starch

ผลการทดลองที่ 1 เมื่อวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหาร Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8 ได้ดีกว่าตัวแทนไอโซเลทในกลุ่มอื่นๆ และในการทดลองที่ 2 เมื่อนำแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 มาเลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับ pH ได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) แต่อัตราการเจริญระหว่างอาหาร 2 ชนิดนี้ก็ไม่ได้มีความแตกต่างกันมากและพบว่า แอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH7 และในการทดลองที่ 3 เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 เลี้ยงลงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับความเข้มข้น NaCl ได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับความเข้มข้น NaCl 0% เชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุด และในการทดลองที่ 4 จะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท FAJ 8 ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยเฉพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่ต่างกัน และจากการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุด

โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนธรรมชาติ ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ มีการสร้าง aerial mycelium สี Vivid Red และ substrate mycelium สี Strong Red ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สร้างสปอร์สายยาวบนอาหาร International Streptomyces Project agar (ISP2) มีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP4 pH8 ได้ดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ ซึ่งถือเป็นข้อดีทางด้านอุตสาหกรรมเนื่องจากถ้าเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหาร ISP4 แทนได้จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายได้เพราะมีแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก และยังเจริญในต่างได้อีกด้วย จากนั้นจึงเลือกไอโซเลท FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหาร ISP2 และ ISP4 ที่มี pH ที่แตกต่าง

กันพบว่าสามารถเจริญได้ในอาหาร ISP4 มากกว่า อาหาร ISP2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Malek *et al.* (2014) ที่รายงานว่า ISP4 สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท จากป่าชายเลนปะหังได้มากที่สุด (31.7%) และ ISP4 ประกอบไปด้วย starch, calcium carbonate และ ammonium sulphate ช่วยในการเจริญของแอกติโนมัยซีท ได้ดี โดยเฉพาะ *Streptomyces* การเติม calcium carbonate จะช่วยส่งเสริมการเจริญของแอกติโนมัยซีท ได้ดียิ่งขึ้น และเมื่อปรับให้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 และ ISP4 มี pH ที่สูงขึ้นพบว่าไอโซเลท FAJ 8 เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 มากกว่า ISP4 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่ 1 และ ชุดการทดลองที่ 2 ที่เลี้ยงในอาหาร ISP4 pH8 ที่สภาวะเดียวกัน พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกัน และแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 เจริญได้ดีมากที่สุดที่สภาวะ pH7 NaCl 0% และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของกรมทรัพยากรทะเลและชายฝั่งที่รายงานว่า ดินป่าชายเลนในจังหวัดสมุทรปราการ ที่ความลึก 0-5 เซนติเมตรมีอุณหภูมิดินอยู่ในช่วง 27.0-31.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 29.0 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.0-6.4 จัดอยู่ในกลุ่มดินที่มีความเป็นกรดปานกลาง และจากข้อมูลสถิติอุตุนิยมหาวิทยาลัย ในช่วงปี 2540-2545 ณ สถานีตรวจอากาศกรมอุตุนิยมหาวิทยาลัย บางนา กรุงเทพฯ ซึ่งใช้เป็นตัวแทน ลักษณะภูมิอากาศของจังหวัด สมุทรปราการ รายงานว่าฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม เป็นระยะเวลา 5 เดือนซึ่งทำให้ดินบริเวณเก็บตัวอย่างมี pH ที่เป็นกลาง ข้อดีของแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 คือสามารถใช้แบ่งได้ ข้อเสียคือไม่สามารถทนเกลือได้

ผลการทดลองที่ได้บนแผ่น TLC สามารถอธิบายตามรูป 4.65 โดยช่องที่ 1 มีการจุด (spot) standard phospholipid maker 3 ตัว คือ L- $\alpha$ -Phosphatidy-DL-glycerol sodium salt (PG), 3-sn Phosphatidylethanolamine (PE), และ Cardiolipin sodium salt (CL) ส่วนช่องที่ 2 และ 3 เป็นการ spot สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท 8 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และ อาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 7 ตามลำดับ โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท 8 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 และ ISP4 พบการสร้างฟอสโฟลิปิด 2 ชนิด คือ phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2559) ค่า  $R_f$  นี้เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการ spot ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายของมัน เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) เนื่องจากสารต่างชนิดกัน จะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนี้ไม่ได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากันการแยกจึงเกิดขึ้น ค่า  $R_f$  ของสารแต่ละชนิด ในวัฏภาคนี้ และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

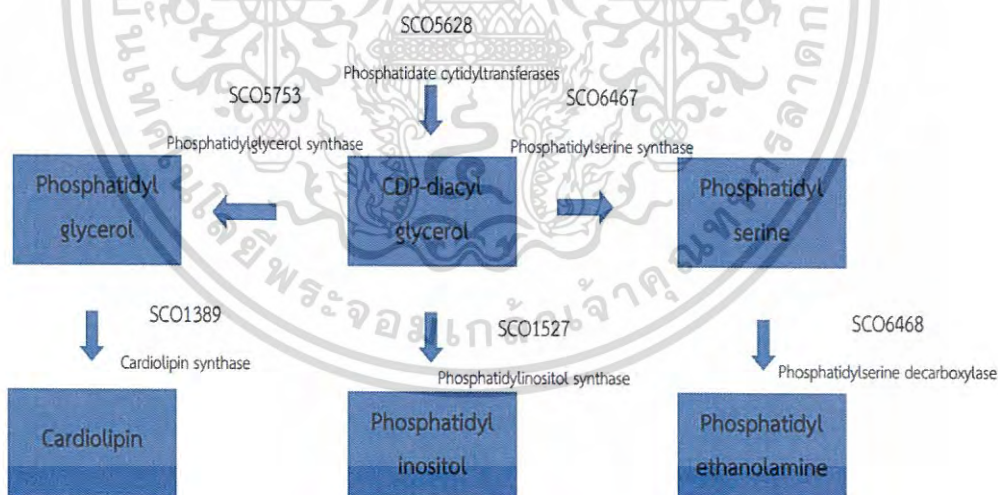
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



All Standard PA PI PS PE PG CL

รูปที่ 4.66 แสดงฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกโดย thin layer chromatography (Klanbut, 2013)

จากผลการทดลองจะพบ cardiolipin มีลักษณะ spot สีขาวขึ้นที่บนสีน้ำเงิน เหมือนในรูป 4.66 ตามการทดลองของ Klanbut พบว่า cardiolipin ที่แยกได้โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography จะขึ้นเป็น spot สีขาวขึ้นที่จุดสีน้ำเงิน



รูปที่ 4.67 แสดงการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดใน *S. coelicolor* (Klanbut, 2013)

จากผลการทดลองพบว่า spot ที่ได้มีความเข้มไม่เท่ากันเนื่องจากปริมาณการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดไม่เท่ากัน อธิบายผลการทดลองโดยอ้างอิงจากรูป 4.67 แสดงการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดใน *S. coelicolor* ดังนี้ CDP-diacyl glycerol เป็น precursor ซึ่งทำการสังเคราะห์ phosphatidylethanolamine ได้มากในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ ISP2 และ ISP4 สังเกตได้จากจุด spot ที่มีสีเข้ม และสังเคราะห์ phosphatidylglycerol ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้น้อย และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phosphatidylglycerol เปลี่ยนไปเป็น cardiolipin จนหมด สังเกตได้จากจุด spot สีขาวที่เห็นได้ชัด บนจุด spot สีน้ำเงิน และ spot ของ phosphatidylglycerol ที่มองไม่เห็น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองที่ 1 จะเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท ในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8 จากรูปที่ 4.32 – 4.41 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหาร Inorganic salts starch (ISP4) ที่ pH 8 ได้ดีที่สุด และมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุดคือ 0.0828 และมีค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) คือ 8.3696

การทดลองที่ 2 จะเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 ระหว่างอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 จากรูปที่ 4.44 – 4.48 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับ pH ได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 7 เชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุดคือ 0.1086 และมีค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) คือ 6.3812

การทดลองที่ 3 จะเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 ระหว่างอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยปรับให้มีความเข้มข้น NaCl ที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6% จากรูปที่ 4.51 – 4.58 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับความเข้มข้น NaCl ได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับความเข้มข้น และ NaCl 0% เชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุดคือ 0.0857 และมีค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) คือ 8.0863

การทดลองที่ 4 จะเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 ระหว่างอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) โดยเพาะเลี้ยงอุณหภูมิที่ต่างกันคือ 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส, 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส จากรูปที่ 4.61 – 4.64 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีการเจริญในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ทุกระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) ซึ่งในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลท FAJ 8 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มากที่สุดคือ 0.0866 และมีค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) คือ 8.0023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท FAJ 8 ในอาหารเหลว International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH7 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 และ ISP4 เชื้อสามารถสังเคราะห์ phosphatidylethanolamine ได้มาก และเปลี่ยน phosphatidylglycerol ไปเป็น cardiolipin จนหมด

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าป้าชายเลนธรรมชาติ ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการเป็นแหล่งที่ค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความหลากหลาย จึงควรมีการศึกษาป้าชายเลนธรรมชาติในพื้นที่ที่แตกต่างกันเพื่อจะสามารถค้นพบแอกติโนมัยซีทที่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น

5.2.2 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลท FAJ 8 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ International Streptomyces Project (ISP2) และอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) และมีแนวโน้มว่าจะเจริญได้ดีในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ได้ดีกว่าจากผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยค่าลอการิทึม แต่ก็ไม่ได้มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันมากนัก หากเราสามารถใช้อาหาร ISP4 ทดแทนการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร ISP2 จะเป็นประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอย่างมากเพราะอาหาร ISP4 มีแหล่งคาร์บอนเป็น starch soluble ซึ่งมีต้นทุนที่ราคาถูกลงกว่า และจากการทดลองครั้งนี้ควรมีการศึกษาเรื่องการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำที่สามารถใช้ทดแทน ISP2 ได้เพื่อให้ลดต้นทุนการผลิตในด้านอุตสาหกรรมต่อไป

5.2.3 จากการทดลองพบว่ามีบางไอโซเลท เช่น FAJ 43 ที่อาจจะเป็น rare actinomycetes ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในทาง Taxonomy

5.2.4 เนื่องจากช่วงใน ช่วง log phase จะพบ cardiolipin มาก (Jakovic *et al.*, 1971) และมีการสังเคราะห์ Antimicrobial ใน Cardiolipin Membranes (Som *et al.*, 2009) เมื่อเลี้ยงถึงขั้น log phase, stationary phase ควรทำการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพื่อพิสูจน์ว่าช่วงที่มีการสร้าง cardiolipin มากจะยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้มาก และ cardiolipin มีส่วนสำคัญที่ช่วยสังเคราะห์สารทุติยภูมิจริงหรือไม่

## เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 2559. ทรัพยากรป่าชายเลนจังหวัดสมุทรปราการ. [Online]. Available: <http://www.dmcr.go.th/bookRead.php?WP=rQAJZTkqZxT5MooOOETyWrTzo7o3Q>
- กลไกการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารความหลากหลายทางชีวภาพจังหวัดสงขลา. 2559. ระบบนิเวศป่าชายเลน. [Online]. Available: <http://www.sc.psu.ac.th/chm/biodiversity/mangrove.html>
- คนาวรรณ พจนาคม และ นันคนา บุรณะโอสถ. (2547). เกสซ์เคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides. ไทยไลซัชชันนิพนธ์ 1: 65-74.
- งามนิจ นนทโส. (2537). การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากดิน. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.
- ชนินทร์ สุริยกุล ณ อุษยา, นำฝน ป้อมทอง, จรรย์ เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนัน และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. (2546). เชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางราเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งในรายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม). หน้า 363-370. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 74 – 96
- บงกชวรรณ สุตะพรรณพินิจ. 2550. การตรวจพิสูจน์เชื้อราก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ. โครงการส่งเสริมงานแต่งตำรา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปวีณา สุขสะอาด, กรรณิการ์ ดวงมาลย์, ชัยวัฒน์ กิตติกุล, กัณทิมาณี ประเดิมวงศ์ และสุ ปฐมอารีย์. แอกติโนมัยซีทจากดินนาเกลือและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. โครงการคลังความรู้ดิจิทัล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2559. โครมาโตกราฟี. [Online]. Available: [http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course\\_info/2302275/chapter9.pdf](http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter9.pdf)
- ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. (2546). “การแยกแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวกในประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์, มรกต สุโขติรัตน์และ ชินจิโตกุยามา. (2548). แอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่จากดินชายฝั่งที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา. ใน 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์. (2548). แอกติโนมัยซีท. ชลบุรี : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิวัฒน์ หันบัญญัติ และเอกภพ สกุกกิจกาญจน์. 2549. “การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากป่าชายเลน.” ปรินญาณีพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สนิท อักษรแก้ว. 2542. ป่าชายเลนนิเวศวิทยาและการจัดการ. พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 227 หน้า.
- สายสมร ล้ายอง. 2547. เอกสารประกอบการสอนวิชาแอคติโนมัยซีส. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2559. ระบบนิเวศป่าชายเลน. [Online]. Available: [http://chm-thai.onep.go.th/CHM/MarineBio/WEBPAGE\\_US ED/MANGROVE.html](http://chm-thai.onep.go.th/CHM/MarineBio/WEBPAGE_US ED/MANGROVE.html)
- สุรีย์ นานาชาติ. 2557. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.
- Arai, T. 1975. Culture media for Actinomycetes. The society for Actinomycetes. Japan. Japan : Asakura Publishing.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Moisture in Animal Feed. (7 .0 0 7 ) Official Methods of Analysis. 1 5 th ed. Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content ISO 6496.
- Atlas of actinomycetes. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan. The society for actinomycetes Japan. (1997).
- Atlas, R.M. 1993 Handbook of Microbiological Media. Florida : CRC Press. Pp.174.
- Bais, Y.G., Nimbekar, T.P., Wanjari, B.E and Timande, S.P. 2012. “Isolation of Antibacterial Compound from Marine Soil Actinomycetes,” *International Journal of Biomedical and Advanced Research*. 3(3) : 193-196.
- Balagurunathan, R. and Subramanian, A. 1993. Studies on marine Streptomyces nigrifaciens (P9) I. Taxonomy and standardization of antibiotic production. *Ciencias Marinas.*, 19(4): 435-443.
- Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M. and Somasundaram, S.T. 2010. “L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments – Selective Isolation, Semi Quantitative Assay and Characterization of Potential Strain”. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(5): 698-705.
- Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M. and Amoroso, M.J. (2 0 0 8 ) . Bioremediation of lindane-contaminated soil by Streptomyces sp. M7 and its effects on Zea mays growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 61, 233-239.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen G., Gao, H., Tang, J., Huang, Y., Chen, Y., Wang, Y., Zhao, H., Lin, H., Xie, Q., and Hong, K (2011). Benzamides and quinazolines from a mangrove actinomycetes *Streptomyces* sp. (No. 061316) and their inhibiting caspase-3 catalytic activity *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 59:447-451
- Dahiya, N., Tawari, R. and Sigh, G.H. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 773-782.
- Das, K.D. (1996). Introductory soil science. Kalyani Publishers. India: New Delhi.
- Dittwer, J.C. and Lester, R.L. 1964. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research.* 5: 126-127.
- Dyson. (2014). *Streptomyces*. P. Dyson, Swansea University, UK.
- Flärdh, K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology.* 6 : 564-571.
- Flärdh, K. 2010. Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology.* 13 : 758-765.
- Flärdh, K. 2012. Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology.* 15 : 737-743.
- Gila, S.V., Pastorb, S. and Marcha. G.J. 2009. Quantitative Isolation of Biocontrol Agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and *Actinomycetes* from Soil with Culture Media. *Microbiological Research.* 164 : 196-205.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W. and Whitman, W.B. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5. 2nded. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Goodfellow, M. and Simpson, K.E. (1987). Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology* 2, 97-125.
- Harald, B., Espen, F., Geir, J and Sergey, B.Z. 2008. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs.* 6(1) : 12-24.
- HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. 2015. A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India.
- Hong, K., Gao, A.H., Xie, Q.Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.P., Yu, H.P., Yao, L.X.H., Goodfellow, M. and Ruan, J.S. 2009. Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. *Marine Drugs.* 7 : 24-47.
- Jakovcic, J., Getz, G.S., Rabinowitz, M., Jakob, H., and Swift, 1971. Cardiolipin content of wild type and mutant Yeasts in relation to Mitochondrial function and development. *The journal of Cell biology.* 4990-502

- Klanbut, K. 2013. The role of phospholipids in the growth and development of Streptomycetes. Ph.D in Microbiology (SIPBS). University of Strathclyde, Glasgow, UK., 50-51
- Küster, E. and Williams, S.T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*. 202: 928-929.
- Lechevalier, M.P., DeBeiever, C. and Lechevalier, H.A. 1977. Chemotaxonomy of Aerobic Actinomycetes : *Int.J.Syst. Bacteriol.* 20 : 435-443
- Lechevalier, M.P., Stern, A.E. and Lechevalier, H.A. 1981. Phospholipids in the taxonomy of Actinomycetes. *Journal of Zentbl Bakteriol Hyg Abt 1Suppl.* 11, 111-116.
- Maitra, P.K. and Roy, S.C. 1960. Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*. *Biochem. J.* 75, 483-487.
- Malek, N.A., Chowdhury, A.J.K., Zainuddin, Z. and Abidin, Z.A.Z. 2014. Selective Isolation of Actinomycetes from Mangrove Forest of Pahang, Malaysia. *Journal of International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences.* 14, 9-13.
- Martin, A. 1961. Actinomycetes. In *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- McCarthy, J.A. and Williams, T.S. 1990. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In R Grigorova and JR Norris (Eds.) *Method in Microbiology*, pp. 535. London: Academic Press Limited.
- Miguélez, E.M., Martín, C., Manzanal, B.M. and Hardisson, C. 1992. Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters.* 100 : 351-359.
- Miguélez, E.M., Rueda, B., Hardisson, C., Manzanal, M.B. 1997. Colony development in *Streptomyces carpinensis*: a streptomycete with substrate mycelium spores. *FEMS Microbiology Letters.* 103-107
- Moustafa, A.E. and Lechevalier, H.A. 1962. Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *APPL. MICROBIOL.* 11 : 75-77.
- Mundie, D.A. 1995. The NBS/ISCC Color System/David A. Mundie Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc-20 (<http://tx4.us/nbs-isc.html>, last access February 2006).
- Pisano, M.A., Sommer, M.J. Lopez, M.M. 1986. Application of pretreatment methods for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl Microbiol.*, 25: 285-288.
- Preparative Thin-layer Chromatography (PLC). [Online]. Available: <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-5.pdf>.

- Prosser, B.L., Palleroni, N.J. 1978. Nutritional Characterization of Some Selected Actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, 516-522.
- Sette, L.D., de Oliveira, V.M. and Manfio, G.P. (2005). Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87, 81-89.
- Som, A., Yang, L., Wong, G.C.L., and Tew, G.N. 2009. Divalent Metal Ion Triggered Activity of a Synthetic Antimicrobial in Cardiolipin Membranes. *J Am Chem*. 28; 131(42)
- Strzelczyk, E. and Leniarska, U. 1985. Production of B-group vitamins by mycorrhizal fungi and actinomycetes isolated from the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant and Soil*. 86, 387-394.
- Thawai, C., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008. *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., Isolated from a Thai Mangrove Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58 : 1516–1521.
- Uvidelio, C., James, K.H. and Gary A.S. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*. 224, 183-190.
- Vobis, G. 1977. Spore development in sporangia-forming. Biological, Biochemical and Biomedical aspects of Actinomycetes. Akademiai Kiado, Budapest ; 443 - 452.
- Zhang, J. 2011. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science*. 5(2) : 124-127.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

สูตรอาหารแต่ละชนิดต่อไปนี้จะเตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่หนึ่งฝาเชื้อ โดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 1. Starch – Casein agar (Küster & Williams, 1964)

Soluble starch	10.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

#### 2. Skim milk agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

Skim milk power	28.0	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

#### 3. Skim milk 10% (วิพัฒน์ และเอกภพ, 2549)

Skim milk power	10.0	กรัม
-----------------	------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4. Bouillon gelation broth (Arai, 1975)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Malt extract	5.0	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

5. Peptone KNO<sub>3</sub> broth (Arai, 1975)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	1.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

## 6. ISP medium no.4 (Inorganic salts-starch agar: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

Soluble starch	10.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0 – 7.4		
Trace salts solution		
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Internation Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) หรือ Yeast extract - malt extract agar (Atlas, 1993)

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.3		

8. Yeast extract - malt extract broth (YEME broth) (Klanbut, 2013)

Malt extract	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	3.0	กรัม
pH 7.3		



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การคำนวณหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจาก (AOAC, 1990)

#### วิธีการคำนวณน้ำหนักดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักปิกเกอร์และสารแขวนลอยของดินที่มีความเจือจางที่  $10^{-1}$  (กรัม) ก่อนอบ  
จาก

$$\text{น้ำหนักปิกเกอร์และดินก่อนอบ} = \text{น้ำหนักปิกเกอร์ (กรัม)} + \text{น้ำหนักสารแขวนลอย  
ของดินที่มีความเจือจางที่ } 10^{-1} \text{ ก่อนอบ (กรัม)}$$

$$\begin{aligned} &\text{คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม) จาก} \\ &\text{ปริมาณน้ำหนักดิน (กรัม)} = \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและปิกเกอร์ก่อน} \\ &\text{อบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและ} \\ &\text{ปิกเกอร์หลังอบ(กรัม)} \end{aligned}$$

#### วิธีการคำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินหลังอบ (กรัม) จาก

$$\text{น้ำหนักดินหลังอบ(กรัม)} = \text{น้ำหนักดินและปิกเกอร์หลังอบ (กรัม)} + \text{น้ำหนักปิกเกอร์ก่อนอบ (กรัม)}$$

คำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน (%) จาก

$$= \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)}} \times 100\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ และการ mount ด้วยสี methylene blue (บงกชวรรณ, 2550)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนแผ่นสไลด์ (slide culture technique) วิธีการที่ประยุกต์มาจากการศึกษาลักษณะเซลล์และสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียเส้นสายมีลักษณะคล้ายเชื้อรา จึงสามารถนำเทคนิค slide culture มาประยุกต์ใช้ได้โดย การเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ จะช่วยให้เห็นลักษณะของเส้นใย และการเรียงตัวของสปอร์ที่แท้จริงชัดเจน และสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้สำหรับอ้างอิง และเป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไปได้

#### ขั้นตอนการทำ

1. การเตรียม sterile culture plates
  - 1.1 วางสำลีปลอดเชื้อชนิดแผ่นที่กั้นจานอาหารเพาะเลี้ยงหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร
  - 1.2 วางแท่งแก้วรูปตั่ววี (ใช้แทนได้ด้วยไม้พินสำลีปลอดเชื้อ 2 ชั้นวางขนานกัน) บนกระดาษซับ
  - 1.3 วางแผ่นสไลด์ที่สะอาดบนไม้พินสำลี และวางแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slips) บนกระดาษซับ ปิดฝาจานอาหารแล้วนำทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 จากนั้นนำไปอบที่ตู้ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้งสนิท พร้อมใช้งาน
2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 2.1 เตรียม Yeast extract-malt agar โดยให้ความหนาของวุ้นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
  - 2.2 วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทาบลงบนแผ่นตารางกระดาษที่ตีช่องขนาด 1x1 เซนติเมตร
  - 2.3 ตัดวุ้นตามเส้นตารางด้วยใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อให้ได้ ก้อนวุ้นมีขนาด 1x1 เซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อไป
3. การ inoculate เชื้อ
  - 3.1 ใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อตัดก้อนวุ้นขนาด 1x1 เซนติเมตร นำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารให้อยู่บริเวณกลางแผ่นสไลด์
  - 3.2 ใช้ needle ปลายงอเขี้ยวเชื้อ จากโคโลนิขนาดประมาณหัวเข็มชดไฟ นำไป inoculate ลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน และคืบแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารปิดลงบนก้อนวุ้น
  - 3.3 เติมน้ำกลั่นให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่นสำลี แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7-14 วันจนกระทั่ง เชื้อมีการเจริญของเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ ตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยไม่ต้องย้อมสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การ mount สไลด์

4.1 หลังจากตรวจพบว่ามีอาการเจริญของเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ของเชื้อแล้ว ให้ใช้คีมคีบยกแผ่นกระจกปิดสไลด์ออกจากก้อนวุ้น แล้วนำแผ่นกระจกมาวางหงายบนกระดาษซับ แล้วหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ จนท่วมบริเวณที่มีเชื้อ เพื่อให้ลดการเกิดฟองอากาศ เมื่อนำแผ่นกระจกปิดสไลด์ไป mount

4.2 หยด methylene blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด แล้วคีบกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อวางทับลงไปให้แนบสนิท ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จะได้แผ่นสไลด์ที่พร้อมส่องกล้องจุลทรรศน์

4.3 นำแผ่นสไลด์ไปตรวจดูรูปร่างลักษณะเส้นใย การเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากต้องการเก็บเป็นสไลด์ถาวร ให้ใช้ทิชชูชุบ methylene blue ส่วนที่ล้นออก รอจนแห้งสนิท ก่อนทาทับบอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ ด้วยน้ำยาทาเล็บทั้งสองด้าน เพื่อป้องกันสีย้อม methylene blue ระบายและป้องกันการปนเปื้อน โดนสามารถเก็บสไลด์ไว้ศึกษาได้เป็นเวลานาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก ง**  
**การเตรียมสารละลายทดสอบในเตรท**  
 (สุรีย์, 2557)

**1. การเตรียมสารละลาย Reagent A: Sulfanilic acid reagent**

ส่วนประกอบของสารละลาย Reagent A: Sulfanilic acid reagent

Sulfanilic acid	1	กรัม
Conc. Acetic acid 5 N	125	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร Sulfanilic acid 1 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ทำการปิเปตสารละลายกรดอะซีติก 5 นอร์มอล ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ถึง 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

**2. การเตรียมสารละลาย Reagent C:  $\alpha$ -naphthol reagent**

ส่วนประกอบของสารละลาย Reagent C:  $\alpha$ -naphthol reagent

$\alpha$ -naphthol reagent	1	กรัม
Conc. Acetic acid 5 N	125	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมโดยการนำ  $\alpha$ -naphthol 1 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ทำการปิเปตสารละลายกรดอะซีติก 5 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ส่วนสารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้น 5 นอร์มอล เตรียมได้โดยการเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 71.25 กรัม

**วิธีการเก็บรักษา**

ควรเก็บสารเคมีทั้งสองชนิด ไว้ในขวดสีชา ที่มีจุกที่ใช้ในการดูดสาร

## ภาคผนวก จ

ตารางที่ 1(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีต 10 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 8

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
FAJ 8	0.0010	0.0014	0.0020	0.0024	0.0020	0.0022	0.0034	0.0041	0.0054	0.0038	0.0020	0.0016
FAJ 9	0.0013	0.0016	0.0021	0.0020	0.0022	0.0028	0.0031	0.0039	0.0040	0.0026	0.0028	0.0020
FAJ 43	0.0009	0.0012	0.0014	0.0014	0.0020	0.0026	0.0035	0.0031	0.0032	0.0029	0.0018	0.0020
FAJ 13	0.0018	0.0020	0.0016	0.0018	0.0019	0.0025	0.0029	0.0036	0.0037	0.0030	0.0029	0.0022
FAJ 14	0.0016	0.0014	0.0014	0.0015	0.0016	0.0019	0.0025	0.0029	0.0030	0.0028	0.0026	0.0023
FAJ 15	0.0017	0.0019	0.0022	0.0026	0.0023	0.0026	0.0030	0.0038	0.0045	0.0048	0.0047	0.0039
FAJ 31	0.0022	0.0019	0.0020	0.0021	0.0019	0.0021	0.0025	0.0029	0.0032	0.0030	0.0029	0.0020
FAJ 36	0.0014	0.0016	0.0014	0.0015	0.0018	0.0027	0.0034	0.0035	0.0034	0.0032	0.0022	0.0016

ตารางที่ 1(จ) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่ระดับ pH 8 (ต่อ)

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
FAJ 50	0.0015	0.0019	0.0021	0.0023	0.0020	0.0019	0.0030	0.0038	0.0040	0.0031	0.0027	0.0020
FAJ 52	0.0020	0.0024	0.0026	0.0027	0.0030	0.0028	0.0037	0.0042	0.0039	0.0034	0.0021	0.0025

ตารางที่ 2(จ) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอสคิตินิมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ที่มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน

ISP2	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
pH5	0.0015	0.0018	0.0023	0.0020	0.0022	0.0026	0.0034	0.0041	0.0044	0.0038	0.0029	0.0021
pH6	0.0018	0.0021	0.0026	0.0031	0.0027	0.0042	0.0049	0.0051	0.0059	0.0048	0.0043	0.0041
pH7	0.0025	0.0027	0.0019	0.0028	0.0030	0.0049	0.0065	0.0076	0.0089	0.0078	0.0067	0.0057
pH8	0.0021	0.0023	0.0025	0.0024	0.0028	0.0036	0.0048	0.0058	0.0062	0.0058	0.0048	0.0041
pH9	0.0009	0.0012	0.0014	0.0022	0.0024	0.0028	0.0031	0.0041	0.0038	0.0038	0.0039	0.0033

ตารางที่ 3(จ) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทีไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่มีระดับ pH ที่แตกต่างกัน

ISP4	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
pH5	0.0014	0.0018	0.0022	0.0029	0.0036	0.0041	0.0042	0.0049	0.0040	0.0039	0.0035	0.0026
pH6	0.0019	0.0023	0.0018	0.0020	0.0028	0.0036	0.0043	0.0054	0.0056	0.0051	0.0048	0.0039
pH7	0.0020	0.0019	0.0022	0.0022	0.0025	0.0044	0.0064	0.0081	0.0092	0.0084	0.0076	0.0054
pH8	0.0012	0.0015	0.0016	0.0017	0.0025	0.0031	0.0041	0.0052	0.0054	0.0050	0.0045	0.0047
pH9	0.0010	0.0014	0.0012	0.0015	0.0027	0.0032	0.0046	0.0048	0.0051	0.0044	0.0036	0.0022

ตารางที่ 4(จ) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีทีไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน

ISP2	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
0%	0.0021	0.0024	0.0025	0.0037	0.0045	0.0057	0.0068	0.0089	0.0065	0.0062	0.0059	0.0042
0.5%	0.0023	0.0021	0.0022	0.0022	0.0039	0.0049	0.0054	0.0068	0.0076	0.0070	0.0071	0.0065
1%	0.0019	0.0020	0.0021	0.0024	0.0032	0.0041	0.0053	0.0061	0.0053	0.0049	0.0043	0.0034
2%	0.0015	0.0019	0.0020	0.0024	0.0032	0.0040	0.0042	0.0050	0.0049	0.0046	0.0035	0.0029
3%	0.0013	0.0015	0.0019	0.0022	0.0026	0.0030	0.0032	0.0040	0.0038	0.0029	0.0026	0.0023
4%	0.0011	0.0009	0.0013	0.0015	0.0016	0.0021	0.0025	0.0026	0.0028	0.0025	0.0017	0.0018
5%	0.0009	0.0012	0.0010	0.0011	0.0015	0.0014	0.0017	0.0020	0.0023	0.0019	0.0015	0.0015
6%	0.0010	0.0008	0.0010	0.0012	0.0013	0.0012	0.0011	0.0014	0.0012	0.0013	0.0008	0.0010

ตารางที่ 5(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน

ISP4	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
0%	0.0021	0.0023	0.0026	0.0038	0.0054	0.0062	0.0079	0.0094	0.0080	0.0082	0.0081	0.0076
0.5%	0.0022	0.0020	0.0022	0.0030	0.0036	0.0054	0.0071	0.0081	0.0079	0.0065	0.0060	0.0054
1%	0.0019	0.0018	0.0020	0.0022	0.0029	0.0037	0.0055	0.0064	0.0073	0.0061	0.0052	0.0043
2%	0.0018	0.0017	0.0019	0.0020	0.0031	0.0039	0.0042	0.0052	0.0054	0.0050	0.0047	0.0032
3%	0.0014	0.0016	0.0015	0.0020	0.0023	0.0028	0.0038	0.0042	0.0045	0.0041	0.0032	0.0029
4%	0.0009	0.0011	0.0014	0.0016	0.0019	0.0024	0.0027	0.0030	0.0032	0.0029	0.0025	0.0023
5%	0.0009	0.0012	0.0012	0.0014	0.0017	0.0019	0.0022	0.0023	0.0026	0.0016	0.0012	0.0013
6%	0.0008	0.0010	0.0009	0.0010	0.0011	0.0013	0.0013	0.0015	0.0018	0.0017	0.0015	0.0005

ตารางที่ 6(จ) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมัยซีทีไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ซึ่งเพาะเลี้ยงระดับอุณหภูมิที่ต่างกัน

ISP2	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
20 °C	0.0015	0.0016	0.0015	0.0017	0.0020	0.0025	0.0028	0.0034	0.0048	0.0047	0.0042	0.0036
30 °C	0.0021	0.0017	0.0022	0.0023	0.0028	0.0035	0.0052	0.0067	0.0079	0.0076	0.0063	0.0061
37 °C	0.0018	0.0015	0.0017	0.0023	0.0031	0.0033	0.0047	0.0054	0.0069	0.0058	0.0043	0.0031
45 °C	0.0016	0.0019	0.0021	0.0020	0.0024	0.0037	0.0042	0.0048	0.0057	0.0049	0.0036	0.0029

ตารางที่ 7(จ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ FAJ 8 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Inorganic salts starch (ISP4) ซึ่งเพาะเลี้ยงระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

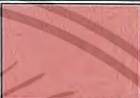

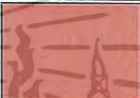









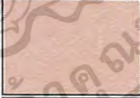







ISP4	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
20 °C	0.0014	0.0016	0.0017	0.0023	0.0027	0.0036	0.0042	0.0049	0.0047	0.0038	0.0026	0.0021
30 °C	0.0017	0.0021	0.0023	0.0024	0.0031	0.0048	0.0052	0.0078	0.0088	0.0075	0.0068	0.0054
37 °C	0.0016	0.0020	0.0018	0.0022	0.0029	0.0034	0.0042	0.0067	0.0072	0.0054	0.0061	0.0058
45 °C	0.0013	0.0019	0.0022	0.0025	0.0030	0.0032	0.0044	0.0064	0.0047	0.0041	0.0036	0.0028

## ภาคผนวก ฉ

### ตารางเทียบกระดาศสีมาตรฐาน (The NBS/IBCC Color System)

(Mundle, 1995)

ตารางที่ ฉ แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (The NBS/IBCC Color System)

Abbreviation, number, color	Munsell (chart span) centroid	Mundie RGB	Mundie Swatch	convert from Munsell	Foster Swatch
Pink					
v.Pk 1 Vivid Pink	(9RP-1R,1-4R) 1R8/13 OUT	#FF7E93		#FFB5BA	
s.Pk 2 Strong Pink	(9RP-1R,1-4R) 1.2R6.9/8.2	#FD7B7C		#EA9399	
deep Pk 3 Deep Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.1R6/11.1	#F3545E		#E4717A	
l.Pk 4 Light Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.6R8.5/4	#FFBCAD		#F9CCCA	
m.Pk 5 Moderate Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.8R7.2/5.3	#EE9086		#DEA5A4	
d.Pk 6 Dark Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.7R5.9/6.1	#C76864		#C08081	
p.Pk 7 Pale Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.0R8.7/2.1	#FFCBBB		#EAD8D7	
gy.Pk 8 Grayish Pink	(9RP-1R,1R- 6R) 2.6R7.2/2.3	#CF9B8F		#C4AEAD	
pkWhite 9 Pinkish White	(1-9R,9R- 1YR,1-7YR) 5.8R9/0.8	#F9DBC8		#EAE3E1	
pkGy 10 Pinkish Gray	(1-9R,9R- 1YR,1-7YR) 9.8R7.4/1	#C8A696		#C1B6B3	
Red					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

v.R 11 Vivid Red	(1-9R) 5R3.9/15.4 OUT	#C10020		#BE0032	
s.R 12 Strong Red	(1-7R) 4R4.4/12.1	#BF2233		#BC3F4A	
deep R 13 Deep Red	(1-9R) 5.1R2.8/10.1	#7B001C		#841B2D	
v.deep R 14 Very Deep Red	(1-9R) 6.5R1.7/8.4	#4F0014		#5C0923	
m.R 15 Moderate Red	(1-7R) 3.8R4.4/9.1	#AB343A		#AB4E52	
d.R 16 Dark Red	(1-9R) 4.0R2.8/6.8	#681C23		#722F37	
v.d.R 17 Very Dark Red	(1-6R) 2R1.2/4.8	#320A18		#3F1728	
l.gy.R 18 Light Grayish Red	(1-8R) 5.3R5.9/3.5	#B17267		#AD8884	
gy.R 19 Grayish Red	(1-8R) 4R4.4/4.8	#8C4743		#905D5D	
d.gy.R 20 Dark Grayish Red	(1-6R) 2.9R2.7/2.1	#482A2A		#543D3F	
Blackish R 21 Blackish Red	(1-6R) 3.9R0.8/1.7 OUT	#1F0E11		#2E1D21	
rGy 22 Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR,1-2YR) 7R5.4/1.3	#8B6C62		#8F817F	
d.rGy 23 Dark Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR) 6R3.4/1	#523C36		#5C504F	
rBlack 24 Reddish Black	(1-9R,9R-1YR) 2R0.9/0.9 OUT	#1E1112		#282022	
Yellowish Pink					






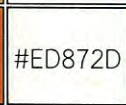

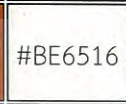



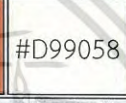

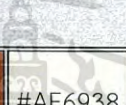

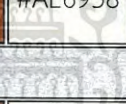

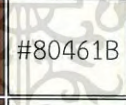
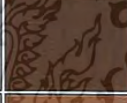
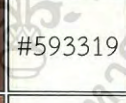

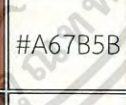
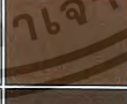
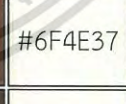

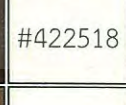
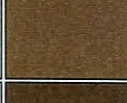
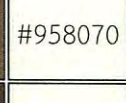
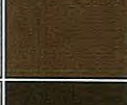
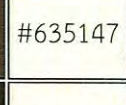
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

v.yPk 25 Vivid Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR) 8R8/13 OUT	#FF845C		#FFB7A5	
s.yPk 26 Strong Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR) 8.4R7/9.5	#FF7A5C		#F99379	
deep yPk 27 Deep Yellowish Pink	(4-7R) 5.5R5.8/12.1	#F64A46		#E66761	
l.yPk 28 Light Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR) 1.9YR8.2/4.6	#FFB28B		#F4C2C2	
m.yPk 29 Moderate Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR) 0.7YR7.2/4.9	#EE9374		#D9A6A9	
d.yPk 30 Dark Yellowish Pink	(6-8R) 7R6/6.1	#CC6C5C		#C48379	
p.yPk 31 Pale Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-8YR) 4.2YR8.6/2.2	#FFC8A8		#ECD5C5	
gy.yPk 32 Grayish Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-5YR) 1.3YR7.2/2.4	#D39B85		#C7ADA3	
Brownish Pink					
brPk 33 Brownish Pink	(5-8YR) 7YR7.1/2.3	#CD9A7B		#C2AC99	
Reddish Orange					
v.rO 34 Vivid Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.8R5.4/14.5	#F13A13		#E25822	
s.rO 35 Strong Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.3R5.4/12.2	#FFB961 see #70		#D9603B	
deep rO 36 Deep Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.2R3.9/12.1	#A91D11		#AA381E	


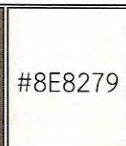
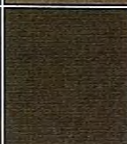
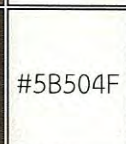

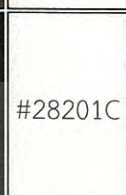





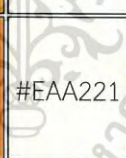







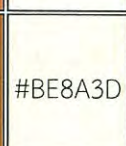
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

m.rO 37 Moderate Reddish Orange	(7-9R,9R- 1YR,1-2YR) 9.3R5.5/9.2	#D35339		#CB6D51	
d.rO 38 Dark Reddish Orange	(7-9R,9R- 1YR,1-2YR) 9.3R4/9.1	#9B2F1F		#9E4732	
gy.rO 39 Grayish Reddish Orange	(8-9R,9R- 1YR,1-3YR) 0.4YR5.4/6.2	#B85D43		#B4745E	
Reddish Brown					
s.rBr 40 Strong Reddish Brown	(9R-1YR,1- 2YR) 0.3YR3.1/9.9	#7F180D		#882D17	
deep rBr 41 Deep Reddish Brown	(6-9R,9R- 1YR,1-2YR) 1.6YR1.5/8.3	#490005		#56070C	
l.rBr 42 Light Reddish Brown	(8-9R,9R- 1YR,1-3YR) 0.5YR5.5/4.1	#AA6651		#A87C6D	
m.rBr 43 Moderate Reddish Brown	(6-9R,9R- 1YR,1-3YR) 9R3.4/5.2	#712F26		#79443B	
d.rBr 44 Dark Reddish Brown	(6-9R,9R- 1YR,1-3YR) 9.6R1.3/3.6	#321011		#3E1D1E	
l.gy.rBr 45 Light Grayish Reddish Brown	(1-5YR) 2.9YR5.4/2.3	#966A57		#977F73	
gy.rBr 46 Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R- 1YR,1-3YR) 9R3.4/2.4	#5E3830		#674C47	
d.gy.rBr 47 Dark Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R- 1YR,1-3YR) 9R2/2	#371F1C		#43302E	
Orange					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

v.O 48 Vivid Orange	(2-7YR) 4.1YR6.5/15 OUT	#FF6800		#F38400	
brill.O 49 Brilliant Orange	(2-7YR) 4YR9/12 OUT	#FFB841		#FD943F	
s.O 50 Strong Orange	(2-7YR) 4.3YR6.5/12.2	#FF6F1A		#ED872D	
deep O 51 Deep Orange	(2-7YR) 4.1YR5.1/11.3	#C34D0A		#BE6516	
l.O 52 Light Orange	(2-7YR) 4.8YR7.8/7.2	#FFA161		#FAB57F	
m.O 53 Moderate Orange	(2-7YR) 4.6YR6.5/8.2	#E8793E		#D99058	
Brownish Orange					
brO 54 Brownish Orange	(2-7YR) 4.1YR5/8	#B15124		#AE6938	
Brown					
s.Br 55 Strong Brown	(2-8YR) 4.6YR3.5/7.6	#753313		#80461B	
deep Br 56 Deep Brown	(2-8YR) 5.6YR2.4/5.2	#4D220E		#593319	
l.Br 57 Light Brown	(3-8YR) 5.4YR5.4/4.8	#A86540		#A67B5B	
m.Br 58 Moderate Brown	(3-8YR) 5.6YR3.5/3.9	#673923		#6F4E37	
d.Br 59 Dark Brown	(3-8YR) 5.3YR1.6/3.4	#35170C		#422518	
l.gy.Br 60 Light Grayish Brown	(5-8YR) 6.4YR5.4/2.2	#946B54		#958070	
gy.Br 61 Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR3.5/1.8	#5A3D30		#635147	
d.gy.Br 62 Dark Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR2/1.5	#32221A		#3E322C	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

l.brGy 63 Light Brownish Gray	(2-8YR,8YR- 1Y,1-4Y) 7YR5.4/1.2	#8B6D5C		#8E8279	
brGy 64 Brownish Gray	(1-8YR,8YR- 1Y,1-4Y) 5.65R3.4/0.9	#503D33		#5B504F	
brBlack 65 Brownish Black	(1-8YR,8YR- 1Y,1-4Y) 7.8YR0.6/0.9 OUT	#140F0B		#28201C	
Orange Yellow					
v.OY 66 Vivid Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 8.6YR7.3/15.2 OUT	#FF8E00		#F6A600	
brill.OY 67 Brilliant Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 0.1Y8.1/10.5 OUT	#FFB02E		#FFC14F	
s.OY 68 Strong Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 9.1YR7.1/11.6	#FF8E0D		#EAA221	
deep OY 69 Deep Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 8.6YR6/12.1 OUT	#D76E00		#C98500	
L.OY 70 Light Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 9.4YR8.3/6.8	#FFB961 see #35		#FBC97F	
m.OY 71 Moderate Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 8.7YR7.2/8.3	#F7943C		#E3A857	
d.OY 72 Dark Orange Yellow	(7-8YR,8YR- 1Y) 9.3YR6/7.9	#C37629		#BE8A3D	








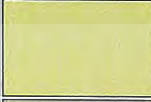






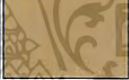
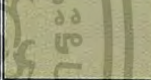





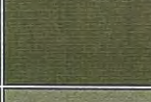


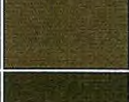

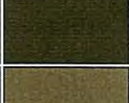
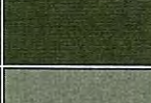


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

p.OY 73 Pale Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.2YR8.7/4.4	#FFCA86		#FAD6A5	
Yellowish Brown					
s.yBr 74 Strong Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.8YR4.6/8.5	#95500C		#996515	
deep yBr 75 Deep Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR3.1/5	#593315		#654522	
l.yBr 76 Light Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR6.5/5	#BB8B54		#C19A6B	
m.yBr 77 Moderate Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.4/3.9	#7D512D		#826644	
d.yBr 78 Dark Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.4YR2.3/3.3	#3F2512		#4B3621	
l.g.yBr 79 Light Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.7YR6.4/2.5	#B48764		#AE9B82	
gy.yBr 80 Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.6/2.1	#785840		#7E6D5A	
d.g.yBr 81 Dark Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR2.5/1.6	#3D2B1F		#483C32	
Yellow					
v.Y 82 Vivid Yellow	(1-7Y) 3.3Y8/14.3 OUT	#FFB300		#F3C300	
brill.Y 83 Brilliant Yellow	(1-7Y) 4.4Y8.7/8.9	#FFCF40		#FADA5E	
s.Y 84 Strong Yellow	(1-7Y) 3.7Y7.2/9.3	#E59E1F		#D4AF37	
deep Y 85 Deep Yellow	(1-7Y) 3.7Y5.9/9.1	#B57900		#AF8D13	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

l.Y 86 Light Yellow	(1-7Y) 4.3Y8.8/6.8	#FFD35F		#F8DE7E	
m.Y 87 Moderate Yellow	(1-7Y) 3.8Y7.1/6.5	#D79D41		#C9AE5D	
d.Y 88 Dark Yellow	(1-7Y) 3.9Y6/6.4	#B07D2B		#AB9144	
p.Y 89 Pale Yellow	(1-7Y) 4.7Y9/3.8	#FFDB8B		#F3E5AB	
gy.Y 90 Grayish Yellow	(1-9Y) 4.4Y7.2/3.8	#CEA262		#C2B280	
d.gy.Y 91 Dark Grayish Yellow	(1-7Y) 3.8Y5.9/4	#A47C45		#A18F60	
yWhite 92 Yellowish White	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 4.5Y9.2/1.2	#FFE2B7		#F0EAD6	
yGy 93 Yellowish Gray	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 3.8Y7.4/1.4	#CAA885		#BFB8A5	
Olive Brown					
l.OLBr 94 Light Olive Brown	(1-4Y) 2.1Y4.9/7.9	#945D0B		#967117	
m.OLBr 95 Moderate Olive Brown	(1-4Y) 2.7Y3.6/5.5	#64400F		#6C541E	
d.OLBr 96 Dark Olive Brown	(1-4Y) 2Y1.9/2.2	#302112		#3B3121	
Greenish Yellow					
v.gY 97 Vivid Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.1Y8.2/12 OUT	#F4C800		#DCD300	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

brill.gY 98 Brilliant Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.8/9.5	#FFDC33		#E9E450	
s.gY 99 Strong Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.2Y7.2/9.2	#CCA817		#BEB72E	
d.gY 100 Deep Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.2Y5.9/9.2 OUT	#9F8200		#9B9400	
l.gY 101 Light Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.9/7	#FFDE5A		#EAE679	
m.gY 102 Moderate Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y7.1/6.5	#C4A43D		#B9B459	
d.gY 103 Dark Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.4Y5.9/6.3	#9B8127		#98943E	
p.gY 104 Pale Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y9/4.2	#FFDF84		#EBE8A4	
gy.gY 105 Grayish Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9Y7.2/3.9	#C4A55F		#B9B57D	
Olive					
l.Ol 106 Light Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.2Y5.1/5.6	#846A20		#867E36	
m.Ol 107 Moderate Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.6Y3.8/5.4	#5E490F		#665D1E	
d.Ol 108 Dark Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.9Y2.4/3.1	#362C12		#403D21	
l.gy.Ol 109 Light Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.85Y5.5/2.5	#8B734B		#8C8767	
gy.Ol 110 Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8Y3.6/2	#52442C		#5B5842	
d.gyOl 111 Dark Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 9.7Y2/1.8	#2B2517		#363527	
l.OLGy 112 Light Olive Gray	(4-9Y,9Y- 2GY,2-4GY) 6.9Y5.5/1.3	#887359		#8A8776	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OLGy 113 Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 8.1Y3.5/0.9	#4D4234		#57554C	
OLBlack 114 Olive Black	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 9Y1.1/0.9	#121910		#25241D	
Yellow Green					
v.YG 115 Vivid Yellow Green not vivid yellowish green see #129	(2-8GY) 5.4GY6.8/11.2 OUT	#93AA00		#8DB600	
brill.YG 116 Brilliant Yellow Green	(2-8GY) 4.9GY8.2/9.1	#CED23A		#BDDA57	
s.YG 117 Strong Yellow Green	(2-8GY) 5.4GY6/8.7	#7F8F18		#7E9F2E	
deep YG 118 Deep Yellow Green	(2-8GY) 7.4GY4.2/7.1	#425E17		#467129	
l.YG 119 Light Yellow Green	(2-8GY) 5GY8.4/5.6	#DCD36A		#C9DC89	
m.YG 120 Moderate Yellow Green	(2-8GY) 4.8GY6/5	#8B8940		#8A9A5B	
p.YG 121 Pale Yellow Green not pale yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 3.4GY8.7/2.4	#F0D698		#DADFB7	
gy.YG 122 Grayish Yellow Green not grayish yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 4.4GY6/2.3	#90845B		#8F9779	
Olive Green					
s.OLG 123 Strong Olive Green	(2-8GY) 4GY3/11 OUT	#0A4500		#404F00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

deep OLG 124 Deep Olive Green	(2-8GY) 4GY1.5/11 OUT	#142300		#232F00	
m.OLG 125 Moderate Olive Green	(2-8GY) 5.7GY3.6/4.8	#434B1B		#4A5D23	
d.OLG 126 Dark Olive Green	(2-8GY) 8GY2.2/3.6	#232C16		#2B3D26	
gy.OLG 127 Grayish Olive Green	(2-8GY) 4.6GY3.5/2	#48442D		#515744	
d.gy.OLG 128 Dark Grayish Olive Green	(2-8GY) 5.4GY2/1.8	#27261A		#31362B	
Yellowish Green					
v.yG 129 Vivid Yellowish Green see #115	(8GY-3G) 1.1G5.9/11.2	#379931		#27A64C	
brill.yG 130 Brilliant Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G7.7/8.6	#8CCB5E		#83D37D	
s.yG 131 Strong Yellowish Green	(8GY-3G) 0.4G5.4/8.7	#478430		#44944A	
deep yG 132 Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 0.9G3.5/9 OUT	#00541F		#00622D	
v.deep yG 133 Very Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 10GY1.5/11 OUT	#002800		#003118	
v.l.yG 134 Very Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.2G8.6/4.6	#C6DF90		#B6E5AF	
l.yG 135 Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.7G7.4/5.2	#007BA7 see #167 #170		#93C592	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

m.yG 136 Moderate Yellowish Green	(8GY-3G) 0.5G5.5/4.8	#657F4B		#679267	
d.yG 137 Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.6G3.5/5	#304B26		#355E3B	
v.d.yG 138 Very Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G1.8/4.3	#132712		#173620	
Green					
v.G 139 Vivid Green	(3-9G) 3.2G4.9/11.1 OUT	#007D34		#008856	
brill.G 140 Brilliant Green	(3-9G) 6.2G6.5/8.3	#47A76A		#3EB489	
s.G 141 Strong Green	(3-9G) 5.8G4.4/8.7 OUT	#006B3C		#007959	
deep G 142 Deep Green	(3-9G) 5.1G3/8.1 OUT	#004524		#00543D	
v.l.G 143 Very Light Green	(3-9G) 6.5G7.8/4.9	#98C793		#8ED1B2	
l.G 144 Light Green	(3-9G) 6G6.4/5.1	#719B6E		#6AAB8E	
m.G 145 Moderate Green	(3-9G) 6.3G4.5/5.1	#386646		#3B7861	
d.G 146 Dark Green	(3-9G) 6.6G2.8/4.6	#203A27		#1B4D3E	
v.d.G 147 Very Dark Green	(3-9G) 8G1.8/3	#16251C		#1C352D	
v.p.G 148 Very Pale Green	(8GY-3G,3-9G) 7.3G8.8/1.9	#D8DEBA		#C7E6D7	
p.G 149 Pale Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 7.6G6.4/1.7	#8D917A		#8DA399	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gy.G 150 Grayish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 8.8G4.5/1.8	#575E4E		#5E716A	
d.gy.G 151 Dark Grayish Green not dark greenish yellowish green or dark grayish yellowish green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 1BG2.9/1.8	#313830		#3A4B47	
blackish G 152 Blackish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 10G1/1.4	#141613		#1A2421	
gWhite 153 Greenish White	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 10G9.2/0.8	#F5E6CB		#DFEDE8	
l.gGy 154 Light Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 3G7.5/0.9	#BAAF96		#B2BEB5	
gGy 155 Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 7.5G5.5/1	#7A7666		#7D8984	
d.gGy 156 Dark Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 1.5BG3.5/0.9	#45433B		#4E5755	
gBlack 157 Greenish Black	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-	#181513		#1E2321	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	10BG) 8.7G1/0.7				
Bluish Green					
v.bG 158 Vivid Bluish Green	(9G-10BG) 5BG5/13 OUT	#00836E		#008882	
brill.bG 159 Brilliant Bluish Green	(9G-10BG) 2.9BG6/9.6 OUT	#009B76		#00A693	
s.bG 160 Strong Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/8.5 OUT	#006D5B		#007A74	
deep bG 161 Deep Bluish Green	(9G-10BG) 2.8BG2.4/8.3 OUT	#00382B		#00443F	
v.l.bG 162 Very Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.4BG8.3/4.6	#A0D6B4		#96DED1	
l.bG 163 Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG6.5/4.9	#669E85		#66ADA4	
m.bG 164 Moderate Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/5	#2F6556		#317873	
d.bG 165 Dark Bluish Green	(9G-10BG) 4.9BG2.7/5 OUT	#013A33		#004B49	
v.d.bG 166 Very Dark Bluish Green	(9G-10BG) 3.6BG1.2/4 OUT	#001D18		#002A29	
Greenish Blue					
v.gB 167 Vivid Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #170 #176	#007BA7 see #135 #170		#0085A1	
brill.gB 168 Brilliant Greenish Blue	(10BG-9B) 4.6B5.9/7.7	#2A8D9C		#239EBA	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

s.gB 169 Strong Greenish Blue	(10BG-9B) 4.9B4.5/8.4 OUT	#00677E		#007791	
deep gB 170 Deep Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #167 #176 same as #167; guess 5B2/9	#007BA7 see #135 #167		#2E8495	
v.l.gB 171 Very Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4B8/4	#A3C6C0		#9CD1DC	
l.gB 172 Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4.5B6.5/5.4	#649A9E		#66AABC	
m.gB 173 Moderate Greenish Blue	(10BG-9B) 4.7B4.5/5.2	#30626B		#367588	
d.gB 174 Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 3.7B2.7/5 OUT	#003841		#004958	
v.d.gB 175 Very Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 5B1.5/3.6 OUT	#022027		#002E3B	
Blue					
v.B 176 Vivid Blue, ultramarine	(9B-5PB,5-7PB) 5B5/14 OUT see #167 #170	#007CAD		#00A1C2	
brill.B 177 Brilliant Blue, celestial blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB5.9/9.4	#4285B4		#4997D0	
s.B 178 Strong Blue, bright blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.9PB4.1/10.4 OUT	#00538A		#0067A5	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

deep B 179 Deep Blue, royal blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.8PB2.5/7.9 OUT	#002F55		#00416A	
v.l.B 180 Very Light Blue, baby blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.7PB7.9/6	#A6BDD7		#A1CAF1	
l.B 181 Light Blue, sky blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB6.4/6.9	#6C92AF		#70A3CC	
m.B 182 Moderate Blue, cerulean blue	(9B-5PB,5-7PB) 3PB4.3/6.8	#395778		#436B95	
d.B 183 Dark Blue, navy blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.2PB1.7/5.5 OUT	#002137		#00304E	
v.p.B 184 Very Pale Blue, cloud blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 1.5PB8.3/3.3	#C1CACA		#BCD4E6	
p.B 185 Pale Blue, alice blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.6PB6.5/2.6	#919192		#91A3B0	
gy.B 186 Grayish Blue, slate blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.2PB4.2/3	#4A545C		#536878	
d.gy.B 187 Dark Grayish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B2.7/2	#2C3337		#36454F	
blackish B 188 Blackish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.8B1.3/1.5	#161A1E		#202830	
bWhite 189 Bluish White	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B9.1/1.2	#F9DFCF		#E9E9ED	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

l.bGy 190 Light Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.2B7.5/1	#BEADA1		#B4BCC0	
bGy 191 Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.9B5.5/0.9	#7D746D		#81878B	
d.bGy 192 Dark Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.3PB3.6/1.1	#464544		#51585E	
bBlack 193 Bluish Black	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.6B1.1/0.8	#151719		#202428	
Purplish Blue					
v.pB 194 Vivid Purplish Blue not very purplish blue	(7-9PB) 7.8PB2/12.5	#20155E		#30267A	
brill.pB 195 Brilliant Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB5.1/9	#62639B		#6C79B8	
s.pB 196 Strong Purplish Blue	(7-9PB) 8PB4/10.9	#474389		#545AA7	
deep pB 197 Deep Purplish Blue	(7-9PB) 7.8PB1.5/8	#1A153F		#272458	
v.l.pB 198 Very Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.4PB7.6/5.2	#BAACC7		#B3BCE2	
l.pB 199 Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB6/6.5	#837DA2		#8791BF	
m.pB 200 Moderate Purplish Blue	(7-9PB) 7.9PB3.5/6.5	#423C63		#4E5180	
d.pB 201 Dark Purplish Blue	(7-9PB) 8PB1.3/4.3	#1A162A		#252440	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

v.p.pB 202 Very Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB8/3.7	#CBBAC5		#C0C8E1	
p.pB 203 Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB6/3.9	#8A7F8E		#8C92AC	
gy.pB 204 Grayish Purplish Blue	(5-9PB) 6.9PB3.4/3.8	#413D51		#4C516D	
Violet					
v.V 205 Vivid Violet	(9PB-3P) 2P5/14	#884BAE		#9065CA	
brill.V 206 Brilliant Violet	(9PB-3P) 9.9PB5.1/9.4	#755D9A		#7E73B8	
s.V 207 Strong Violet	(9PB-3P) 0.2P3.7/10.1	#53377A		#604E97	
deep V 208 Deep Violet	(9PB-3P) 1.1P1.2/8.6	#240935		#32174D	
v.l.V 209 Very Light Violet	(9PB-3P) 2P8.5/7 OUT	#EEBEF1		#DCD0FF	
l.V 210 Light Violet	(9PB-3P) 0.5P5.6/7.1	#876C99		#8C82B6	
m.V 211 Moderate Violet	(9PB-3P) 1.4P3.6/7	#543964		#604E81	
d.V 212 Dark Violet	(9PB-3P) 1.4P1.3/4.9	#22132B		#2F2140	
v.p.V 213 Very Pale Violet	(9PB-3P) 9.7PB7.9/3.7	#D8B1BF		#C4C3DD	
p.V 214 Pale Violet	(9PB-3P) 1.3P6/4	#957B8D		#9690AB	
gy.V 215 Grayish Violet	(9PB-3P) 1.2P3.3/3.9	#46394B		#554C69	
Purple					
v.P 216 Vivid Purple	(3-9P) 6P4.5/14.0	#943391		#9A4EAE	
brill.P 217 Brilliant Purple	(3-9P) 6P7/11	#DD80CC		#D399E6	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

s.P 218 Strong Purple	(3-9P) 6.5P4.3/9.2	#803E75		#875692	
deep P 219 Deep Purple	(3-9P) 6.3P2.7/9.1	#531A50		#602F6B	
v.deep P 220 Very Deep Purple	(3-9P) 5P1.5/8	#320B35		#401A4C	
v.l.P 221 Very Light Purple	(3-9P) 6.5P7.8/5.1	#E3A9BE		#D5BADB	
l.P 222 Light Purple	(3-9P) 6.2P6.5/6.5	#BA7FA2		#B695C0	
m.P 223 Moderate Purple	(3-9P) 6.6P4.5/7.1	#7F4870		#86608E	
d.P 224 Dark Purple	(3-9P) 6.3P2.8/4.9	#472A3F		#563C5C	
v.d.P 225 Very Dark Purple	(3-9P) 6.9P1/4.5	#230D21		#301934	
v.p.P 226 Very Pale Purple	(9PB-3P,3-9P) 5.5P8.2/3.2	#E6BBC1		#D6CADD	
p.P 227 Pale Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 7.9P6.4/3.1	#AE848B		#AA98A9	
gy.P 228 Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 8.1P4.5/2.7	#72525C		#796878	
d.gy.P 229 Dark Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 0.5RP2.8/2	#452D35		#50404D	
blackish P 230 Blackish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 0.8RP0.9/1.6 OUT	#1D1018		#291E29	


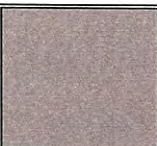

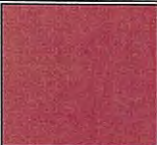



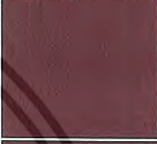



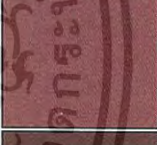


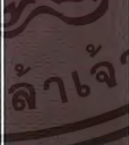







เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pWhite 231 Purplish White	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 2.5RP9/0.8	#FADBC8		#E8E3E5	
l.pGy 232 Light Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 0.3RP7.5/1.1	#C8A99E		#BFB9BD	
pGy 233 Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP5.5/0.9	#88706B		#8B8589	
d.pGy 234 Dark Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP3.6/1	#564042		#5D555B	
pBlack 235 Purplish Black	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 9.54P0.9/0.6 OUT	#1B1116		#242124	
Reddish Purple					
v.rP 236 Vivid Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP3/14 OUT	#7E0059		#870074	
s.rP 237 Strong Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP4.4/10.2	#9A366B		#9E4F88	
deep rP 238 Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP2.8/9.5	#641349		#702963	
v.deep rP 239 Very Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 0.9RP1.9/8.9	#470736		#54194E	
l.rP 240 Light Reddish Purple	(9P-3RP) 0.7RP6/6.9	#BB6C8A		#B784A7	







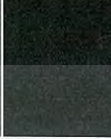
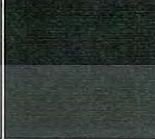
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

m.rP 241 Moderate Reddish Purple	(9P-3RP) 0.8RP4.5/7	#8C4566		#915C83	
d.rP 242 Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP2.8/4.8	#4F273A		#5D3954	
v.d.rP 243 Very Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.5RP1/4.8	#270A1F		#341731	
p.rP 244 Pale Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP6/4.2	#AC7580		#AA8A9E	
gy.rP 245 Grayish Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP4.5/4.2	#7D4D5D		#836479	
Purplish Pink					
brill.pPk 246 Brilliant Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 6RP8.5/11 OUT	#FF97BB		#FFC8D6	
s.pPk 247 Strong Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 5.6RP6.8/9	#F6768E		#E68FAC	
deep pPk 248 Deep Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 4.4RP6/12.2	#EB5284		#DE6FA1	
l.pPk 249 Light Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 4.6RP8/5.5	#FFA8AF		#EFBBCC	
m.pPk 250 Moderate Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 4.6RP6.8/6.7	#E28090		#D597AE	
d.pPk 251 Dark Purplish Pink	(3-9RP) 6.4RP5.9/7	#C76574		#C17E91	
p.pPk 252 Pale Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 3.7RP8.4/3.3	#FDBDBA		#E8CCD7	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gy.pPk 253 Grayish Purplish Pink	(9P-3RP,3- 9RP) 3.7RP7/3.5	#CC9293		#C3A6B1	
Purplish Red					
v.pR 254 Vivid Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.6RP4.9/13.6	#D5265B		#CE4676	
s.pR 255 Strong Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.3RP4.4/11.4	#B32851		#B3446C	
deep pR 256 Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.3RP2.6/10.1	#6F0035		#78184A	
v.deep pR 257 Very Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 6.8RP1.7/8	#470027		#54133B	
m.pR 258 Moderate Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.1RP4.5/9	#A73853		#A8516E	
d.pR 259 Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.1RP2.7/6	#5B1E31		#673147	
v.d.pR 260 Very Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 6.6RP0.9/4.8 OUT	#28071A		#38152C	
l.gy.pR 261 Light Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7.8RP5.9/4.2	#B27070		#AF868E	
gy.pR 262 Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP- 1R) 7RP4.5/5.1	#8C4852		#915F6D	
Neutral					
White 263 White	(all) 2.5PB9.5/0.2	#FFC9D7		#F2F3F4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

l.Gy 264 Light Gray	(all) 6.7Y7.4/0.2	#C2A894		#B9B8B5	
med.Gy 265 Medium Gray	(all) 3.3GY5.4/0.1	#817066		#848482	
d.Gy 266 Dark Gray	(all) 2.5PB3.5/0	#49423D		#555555	
Black 267 Black	(all) 2.5PB0.8/0 OUT	#131313		#222222	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุ	ลักษณะสปอร์
1 (Purple)	FAJ 39	๗๘	Light Purplish Gray #BFB9BD	Dark Reddish Purple #4F273A	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ไม่สร้างสปอร์
	FAJ 50	๗๘	Light Purplish Gray #BFB9BD	Light Gray #C2A894	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
2 (Yellow)	FAJ 15	๗๘	Yellowish White #F0EAD6	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ไม่สร้างสปอร์
	FAJ 16	๗๘	Yellowish Gray #BFB8A5	Deep Yellow #B57900	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายยาว
	FAJ 38	๗๘	Yellowish White #F0EAD6	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ไม่สร้างสปอร์
	FAJ 43	๗๘	Pale Yellow #F3E5AB	Brilliant Yellow #FFCF40	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ทรงกลมต่อกัน เป็นเส้น
	FAJ 51	๗๘	Yellowish White #F0EAD6	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น

ตารางที่ ข แสดงลักษณะสีฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุ	ลักษณะสปอร์
2 (Yellow)	FAJ 54	ดี	Yellowish White #F0EAD6	Grayish Yellow #CEA262	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 56	ดี	Yellowish White #F0EAD6	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
3 (Green)	FAJ 3	ดี	Light Greenish Gray #BAAF96	Very Pale Green #D8DEBA	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ไม่สร้างสปอร์
	FAJ 6	ดี	Dark Greenish Gray #45433B	Deep Yellow #B57900	Light Orange #fab57f	ไม่สร้างสปอร์
	FAJ 31	ดี	Greenish Gray #7A7666	Light Greenish Gray #BAAF96	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายยาว
4 (Neutral)	FAJ 36	ดี	White #F2F3F4	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 37	ดี	White #F2F3F4	Light Gray #C2A894	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 44	ดี	Light Gray #B9B8B5	Pale Orange Yellow #FFCA86	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 55	ดี	White #F2F3F4	Grayish Yellow #CEA262	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น

ตารางที่ ข แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุ	ลักษณะสปอร์
5 (Red)	FAJ 5	๓๑	Strong Red #BF2233	Moderate Red #AB343A	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 8	๓๑	Vivid Red #C10020	Strong Red #BF2233	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายยาว
6 (Orange Yellow)	FAJ 9	๓๑	Pale Orange Yellow #FAD6A5	Brilliant Orange Yellow #FFB02E	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 45	๓๑	Pale Orange Yellow #FFCA86	Brilliant Orange Yellow #FFB02E	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ไม่สร้างสปอร์
7 (Pink)	FAJ 7	๓๑	Pale Pink #FFCBBB	Pinkish White #F9DBC8	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 13	๓๑	Pinkish White #EAE3E1	Light Yellow #FFD35F	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายยาว
	FAJ 33	๓๑	Pale Pink #FFCBBB	Pinkish White #F9DBC8	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์บิดเป็นเกลียว
	FAJ 46	๓๑	Light Pink #FFBCAD	Light Yellowish Pink #FFB28B	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น

ตารางที่ ข แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลท	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุ	ลักษณะสปอร์
7 (Pink)	FAJ 53	ดี	Pinkish White #F9DBC8	Grayish Pink #CF9B8F	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายยาว
8 (Brown)	FAJ 11	ดี	Light Brownish Gray #8E8279	Light Greenish Gray #BAAF96	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	สปอร์สายสั้น
	FAJ 14	ดี	Light Grayish Brown #958070	Strong Brown #753313	Deep Reddish Brown #490005	สปอร์บิดเป็นเกลียว
9 (Olive)	FAJ 34	ดี	Olive Gray #57554C	Dark Grayish Yellow #A47C45	Medium Gray #817066	ไม่สร้างสปอร์
10 (Greenish Yellow)	FAJ 52	ดี	Pale Greenish Yellow #EBE8A4	Pale Greenish Yellow #FFDF84	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำได้	ทรงกลมต่อกัน เป็นเส้น

# ประวัติผู้วิจัย



ชื่อ-นามสกุล นางสาวณัฐญาดา ทศชา  
ชื่อเล่น เพม  
วันเดือนปีเกิด 11 กุมภาพันธ์ 2537  
ภูมิลำเนา สมุทรปราการ  
ที่อยู่ปัจจุบัน 38/1 ม.8 หมู่บ้าน ทรัพย์บัวหลวง ตำบลบางปูใหม่ อำเภอเมือง  
จังหวัดสมุทรปราการ 10280  
E-mail learning\_11@live.com  
เบอร์โทรศัพท์ 080-265-4015  
Facebook www.facebook.com/nutyada.toscha  
ประวัติการศึกษา  
2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)  
โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ  
เกรดเฉลี่ย 3.44  
2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้วิจัย



ชื่อ-นามสกุล นางสาวนฤมล กันทะ  
ชื่อเล่น จอย  
วันเดือนปีเกิด 4 เมษายน 2537  
ภูมิลำเนา เชียงใหม่  
ที่อยู่ปัจจุบัน 6/71 หมู่บ้านเกษมกล แหวงบางชั้น เขตคลองสามวา กรุงเทพฯ 10510  
E-mail Naluemon\_beautiful@hotmail.com  
เบอร์โทรศัพท์ 097-232-8960  
Facebook www.facebook.com/naluemon.kanta  
ประวัติการศึกษา  
2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)  
โรงเรียนนวมินทราชูทิศ กรุงเทพมหานคร  
เกรดเฉลี่ย 3.51  
2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้วิจัย



ชื่อ-นามสกุล นางสาวนันทิสรา ณ ระนอง  
ชื่อเล่น อุ้ม  
วันเดือนปีเกิด 2 มิถุนายน 2536  
ภูมิลำเนาเดิม สมุทรปราการ  
ที่อยู่ปัจจุบัน 123 หมู่ 2 ซอยวัดสวนส้ม ถนนปู่เจ้าสมิงพราย ตำบลสำโรงใต้  
อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130  
E-mail aumaumaumaum@live.com  
เบอร์โทรศัพท์ 090-976-0730  
Facebook www.facebook.com/aum.aumm.967  
ประวัติการศึกษา  
2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)  
โรงเรียนสมุทรปราการ  
จังหวัดสมุทรปราการ เกรดเฉลี่ย 3.44  
2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้