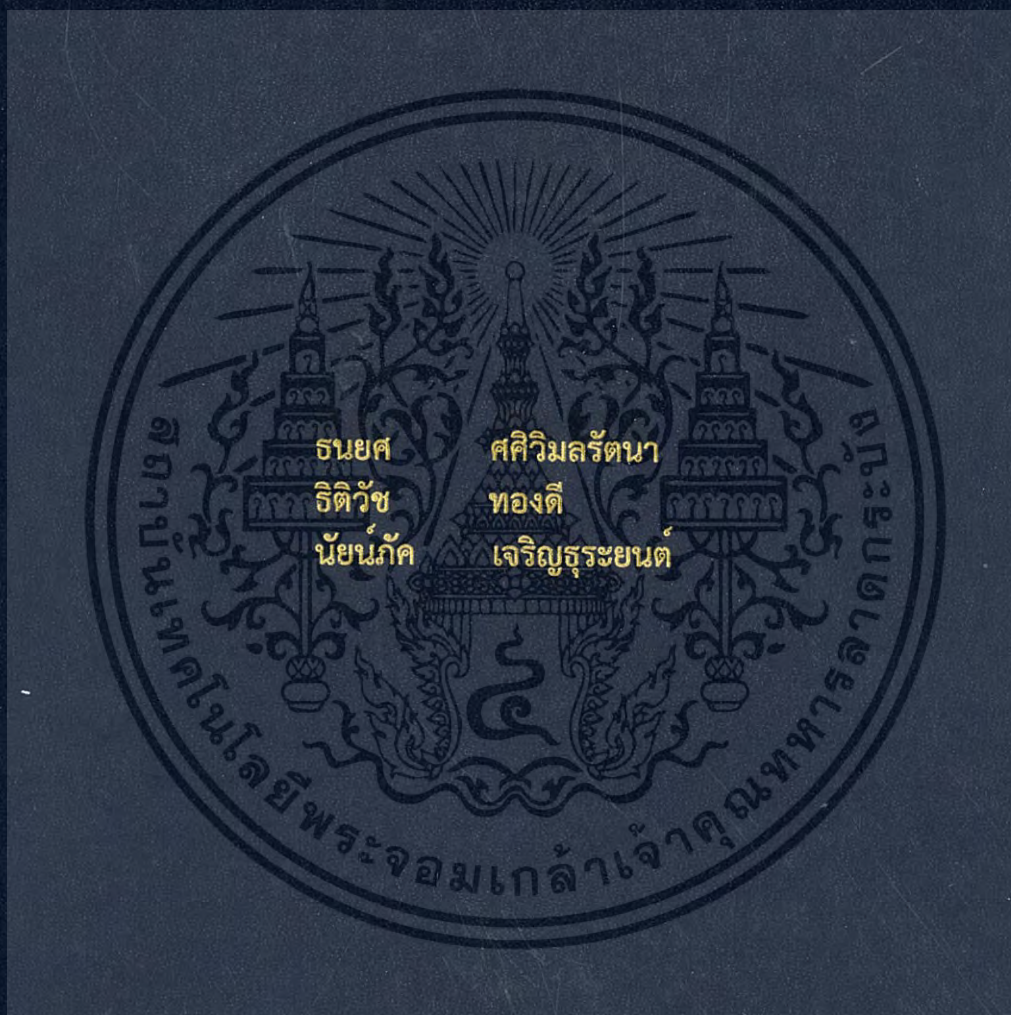


การศึกษาฟอสโฟลิปิด และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจาก  
ดินป่าชายเลนบางปู จังหวัดสมุทรปราการ

Phospholipids study and antimicrobial activity of actinomycetes  
from mangrove forest soil of Bangpoo, Samut Prakan



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาฟอสโฟลิปิด และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจาก  
ดินป่าชายเลนบางปู จังหวัดสมุทรปราการ  
Phospholipids study and antimicrobial activity of actinomycetes  
from mangrove forest soil of Bangpoo, Samut Prakan



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHOSPHOLIPIDS STUDY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
ACTINOMYCETES FROM MANGROVE FOREST SOIL OF BANGPOO,  
SAMUT PRAKAN



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาฟอสโฟลิปิด และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนบางปู จังหวัดสมุทรปราการ		
ชื่อนักศึกษา	นายธนยศ ศศิวิมลรัตน์	รหัสนักศึกษา	55051289
	นายธิติวัช ทองดี	รหัสนักศึกษา	55051297
	นางสาวนัยน์ภัค เจริญธรรณนต์	รหัสนักศึกษา	55051312
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์		

### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท 31 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ และจากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะสีของเส้นใยเหนือผิวอาหาร และสีของเส้นใยใต้ผิวอาหารเป็นเกณฑ์ แล้วจึงคัดเลือกตัวแทนเชื้อแอคติโนมัยซีทจากการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อ โดยคัดเลือกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 มาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทต่อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ 4 ชนิดจากทั้งหมด 6 ชนิด สามารถคิดเป็นร้อยละ ได้ดังนี้ *Bacillus subtilis* ร้อยละ 24, *Micrococcus luteus* ร้อยละ 29, *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 18 และ *Escherichia coli* ร้อยละ 29 จากนั้นจึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาได้ 5 ไอโซเลต มาทำการตรวจวิเคราะห์หาฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography เทียบกับ ฟอสโฟลิปิดมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด คือ phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL)

**คำสำคัญ :** กิจกรรมการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์, ดินป่าชายเลน, ฟอสโฟลิปิด, แอคติโนมัยซีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Phospholipids study and antimicrobial activity of actinomycetes from mangrove forest soil of Bangpoo, Samut Prakan	
Students	Mr. Thanayod Sasivimolrattana	Student ID 55051289
	Mr. Titivat Tongdee	Student ID 55051297
	Miss Naiyapak Charanthurayont	Student ID 55051312
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)	
Department	Biology	
Academic Year	2015	
Advisor	Dr. Khanungkan Klanbut	

### Abstract

Thirty-one actinomycetes strains were isolated from mangrove forest soil of Bangpoo, Samut Prakan and Bang Pakong, Chachoengsao. All isolates could be separate into 12 groups by using the colour of the erection mycelium. Five isolates obviously produce the antimicrobial activity on agar plate. Then the fermentation broth of 5 selected isolates were extracted with ethylacetate. This crude extract were test for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 and *Candida albicans* ATCC 90028. The result revealed that crude extract inhibited the growth of 4 microorganisms; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (24%), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (29%), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (18%) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (29%) respectively. Furthermore, the arrangement of phospholipids (PLs) on thin layer chromatography were receiving attention by the major of PLs in actinomycetes including phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL) and phosphatidylethanolamine (PE) spots which appeared in order compared with PLs standard.

Keywords : Actinomycetes, Antimicrobial activity, Mangrove forest soil, Phospholipids

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหลายๆฝ่ายที่ได้ให้ความกรุณาทั้งด้านความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการให้ข้อมูลต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยอย่างยิ่ง ตลอดจนการแก้ไข และตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ลุล่วงสมบูรณ์ ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไผ่ ประธานกรรมการ และ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย กรรมการ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ คำแนะนำ ตลอดจนสละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และเอาใจใส่ตลอดการดำเนินงาน รวมถึงการตรวจทานแก้ไขรูปเล่ม ชี้แนะและแก้ไขข้อผิดพลาด และให้ข้อมูลต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดการศึกษา ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการนิติจุฬารณวัลย์ ลักษณะ ตึกวิทยุเก่า และอาคารพระจอมเกล้า ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเปิดอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ธุรการ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารที่ให้ความอนุเคราะห์ในการขอใช้อาคารสถานที่ในการทำ การทดลอง

ขอขอบพระคุณ คุณนริศ เกื้อกุลพัฒนา นิสิตรดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษา และแนะนำในการวางแผนการทดลอง ขอขอบพระคุณ คุณอัญชลี เจริญศรี ที่แนะนำท่าเรือ คนขับเรือ และอำนวยความสะดวก ในการออกเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนบริเวณแม่น้ำบางปะกง อำเภอบางปะกง จังหวัด ฉะเชิงเทรา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกภายในครอบครัว รวมถึงผู้มีอุปการคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงที่กรุณาอบรมสั่งสอนให้เป็นคนดีและสนับสนุนทั้งกำลังกาย กำลังทรัพย์ และกำลังใจแก่คณะ ผู้ทำการวิจัย และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้ข้อมูล และให้คำแนะนำตลอดการทำ โครงงานพิเศษครั้งนี้

ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณที่ทั้งปวงให้แก่ทุกท่าน

นายธนยศ ศศิวิมลรัตนานา

นายธิติวัช ทองดี

นางสาวนัยน์ภัค เจริญธรรณนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอกติโนมัยซีท	6
2.2 การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีท	7
2.3 การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีท	8
2.4 นิเวศวิทยาของ Actinomycetes	9
2.5 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีท	9
2.6 แอกติโนมัยซีท genus <i>Streptomyces</i>	10
2.7 ยาปฏิชีวนะ	11
2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ	12
2.9 Secondary metabolites ใน actinomycetes	12
2.10 Rare actinomycetes	15
2.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion	17
2.12 ฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท และแบคทีเรียทั่วไป	17
2.13 จุลินทรีย์ในดินและแอกติโนมัยซีทในดินป่าชายเลน	18
2.14 เชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ	19
2.15 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ	21
2.16 ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.16.1 การตกตะกอน และการย่อยสลายโปรตีน ในน้ำนม	21
2.16.2 การย่อยสลายเจลาติน (gelatin liquefaction)	22
2.16.3 การย่อยสลายไนเตรท (nitrate reduction test)	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	106
เอกสารอ้างอิง	110
ภาคผนวก	116
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	117
ภาคผนวก ข การคำนวณคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง	121
ภาคผนวก ค กระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)	123
ภาคผนวก ง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ และการ mount ด้วยสี methylene blue	145
ภาคผนวก จ การเตรียมสารละลายทดสอบไนเตรด	147
ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5	148
ภาคผนวก ช การเตรียมสารละลาย molybdenum blue spray	149
ภาคผนวก ซ ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน	150
ภาคผนวก ฌ ภาพถ่ายแสดงตัวอย่างผลการทดสอบทางชีวเคมี	153
ภาคผนวก ฎ เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	158
ประวัติผู้วิจัย	160

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ	14
2.2 สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล	15
2.3 สารปฏิชีวนะชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทกลุ่มหายาก (Rare actinomycetes)	16
4.1 แสดงความสูงจากระดับน้ำทะเล	36
4.2 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้	38
4.3 แสดงปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเงือจาง $10^{-1}$ หลังอบ	40
4.4 แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักของดินคงที่	42
4.5 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน	44
4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท	47
4.7 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท	53
4.8 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	80
4.9 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion	84
4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion	85
4.11 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค thin layer chromatography และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวแทนเชื้อที่คัดเลือกมาทั้ง 5 ไอโซเลต	94
ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)	123

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทใน Order <i>Actinomycetales</i> ด้วย phylogenetic tree	7
2.2 การสร้างสปอร์ของ <i>Streptomyces coelicolor</i>	8
2.3 ลักษณะ spore chains ของ <i>Streptomyces griseus</i> เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ scanning electron microscope (SEM)	10
2.4 ลักษณะการสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium ของ genus <i>Streptomyces</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
2.5 โครงสร้างหลักของยาปฏิชีวนะ macrolides กลุ่มต่างๆ	12
2.6 Rare actinomycetes สายพันธุ์ต่างๆที่ค้นพบ ที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้	16
4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10	55
4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-11	56
4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21	57
4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-26	57
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32	58
4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-12	59
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-31	59
4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35	60
4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32	61
4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-14	61
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-30	62
4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP12-24	63
4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-29	64
4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-33	64
4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-37	65
4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-38	66
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-40	66
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP25-46	67
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-56	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-34	68
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-27	69
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-28	70
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36	71
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-39	72
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP24-43	72
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-55	73
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP28-58	74
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-42	75
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-54	75
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP25-47	76
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP26-50	77
4.32 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยแอกติโนมัยซีท ด้วยการทดสอบเบื้องต้น	81
4.33 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพของสารสกัดหยาบใน ชั้นของเอทิลอะซีเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion	84
4.34 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ จากเซลล์และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion	85
4.35 แสดงลักษณะโครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย	87
4.36 แสดงลักษณะโครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม	87
4.37 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ของยีสต์	88
4.38 โครงสร้างโมเลกุลของเพนิซิลิน ซึ่งมี $\beta$ -lactam ring เป็นองค์ประกอบ	88
4.39 กลไกการทำงานของเพนิซิลิน ซึ่งมี $\beta$ -lactam ring เป็นองค์ประกอบ	89
4.40 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีโดยเทียบกับสาร standard	92
4.41 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP9-10	96
4.42 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP9-10	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.43 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP11-21	98
4.44 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP11-21	98
4.45 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP18-27	100
4.46 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP18-27	100
4.47 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP21-35	102
4.48 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP21-35	102
4.49 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP22-36	104
4.50 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP22-36	104
ก แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง	150
ข แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 1, 9, 10, 11, 12, 18, 19 และ 20	151
ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 และ 28	152
ณ(๑) แสดงผลทดสอบการตกตะกอน ในหลอดอาหาร Skim milk 10%	153
ณ(๒) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar	154
ณ(๓) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth	155
ณ(๔) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO <sub>3</sub> broth	156
ณ(๕) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar	157
ญ(๑) แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread-plate Technique	158
ญ(๒) แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak Technique	159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการพบปัญหาเชื้อโรคดื้อยามากขึ้น ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนเกิดความจำเป็น โดยพบผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อ จากจุลินทรีย์ที่ดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 1 แสนคน (สำนักงานนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข, 2556) จึงต้องมีการคิดค้นยาและสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่อยู่ตลอดเวลา โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติในบริเวณต่างๆในประเทศไทย อาทิเช่น ดินจากป่าชายเลน น้ำทะเล นาเกลือ ดินจากป่าไม้ที่อุดมสมบูรณ์ เป็นต้น

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศทางธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีไม้ยืนต้นหลากหลายชนิด ได้แก่ ต้นโกงกาง ต้นลำพู ต้นฟังกาหัวส้ม และต้นจาก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสาหร่ายอีกหลายชนิด ป่าชายเลนจึงมีบทบาทสำคัญในการเป็นส่วนเชื่อมต่อระบบนิเวศบนบก และระบบนิเวศทางทะเล โดยป่าชายเลนมีหน้าที่หลักอยู่สองประการคือ ป่าชายเลนทำหน้าที่ดักตะกอนที่ปะปนมาจากน้ำจืด ไม่ให้ไหลลงสู่ทะเลมากเกินไป จึงช่วยลดผลกระทบต่อการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ เช่น สาหร่ายชนิดต่างๆ ซึ่งจะไม่ทำให้มีสาหร่ายเจริญมากเกินไป และป่าชายเลนยังทำหน้าที่ในการส่งถ่ายธาตุอาหารและอินทรีย์สารจากบริเวณชายฝั่ง ออกสู่น้ำทะเลบริเวณใกล้เคียง (ณภัทร, 2553) จึงกล่าวได้ว่าป่าชายเลนเป็นส่วนหนึ่งของบริเวณเขตน้ำจืดที่เรียกบริเวณนี้ว่าป่าชายเลน เป็นเพราะดินบริเวณนี้มีลักษณะเป็นดินเลน สิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณนี้จึงมีคุณสมบัติพิเศษต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากเกิดการปรับตัวในด้านต่างๆจนสามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมนี้ได้ โดยไม่มีการสูญเสีย และสามารถทนอยู่ได้ในบริเวณที่ได้รับผลกระทบจากน้ำขึ้นน้ำลง (ธีรธรรม, 2550)

จากการที่ป่าชายเลนมีระบบนิเวศที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลายทางชีวภาพ จึงเป็นสถานที่ที่มีความน่าสนใจในการศึกษาทางด้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน เนื่องจากดินมีลักษณะเป็นรูปพรุนที่มีอากาศ น้ำ และแร่ธาตุอาหารซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซีท สาหร่าย และไวรัส (ธีรธรรม, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่ง ที่สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) มีลักษณะคล้ายรา แต่จะมีการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) และนอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทยังมีค่า GC content สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป โดยลักษณะของโคโลนีของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะเป็นผง และทึบแสง เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งไม่มันวาวเมื่อดูด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี่ แอกติโนมัยซีทสามารถสร้างสารรงควัตถุสีต่างๆ อาทิเช่น สีขาว สีเทา สีส้ม สีเขียว สีแดง สีน้ำตาล สีชมพู สีม่วง และสีดำ (รัตนกรณ, 2548) แอกติโนมัยซีทสามารถพบได้ในดินทั่วไป โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยซีท ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน และปริมาณอินทรีย์วัตถุ นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทยังสามารถนำมาสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือเชื้อในสกุล *Streptomyces* (จิตติ, 2552)

แอกติโนมัยซีทมีอยู่เป็นจำนวนมากและมีอยู่ทั่วไปไม่เฉพาะแต่ในดิน แต่หลายชนิดจะอาศัยอยู่เป็นส่วนประกอบของปุ๋ยหมัก ตะกอนดินก้นทะเลสาบ และตะกอนในแหล่งน้ำ แอกติโนมัยซีทมีปริมาณมากเป็นอันดับสองของแบคทีเรียที่พบในดิน ซึ่งมีจำนวน  $10^5$  -  $10^8$  propagules / g soil (propagule เป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตและสืบพันธุ์ได้) แอกติโนมัยซีทจะพบมากในทุ่งหญ้า ดินในแปลงเพาะปลูก และดินที่ทำการเกษตรตามลำดับ ซึ่งปริมาณของเชื้อที่พบจะขึ้นอยู่กับสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบนิเวศ ถ้าขุดดินให้ลึกลงจำนวนของแอกติโนมัยซีทจะลดลง แต่มีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นเพิ่มขึ้นเนื่องจากยิ่งลึก จะยังมีอากาศน้อย (มลล้าฐ และคณะ, 2545) แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินมักมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ และ extracellular enzymes ที่หลากหลาย โดยแอกติโนมัยซีทบางสายพันธุ์สามารถที่จะผลิตสารที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชบางชนิดได้ (Dombou et al., 2001)

สเตรปโตมัยซีท (*Streptomyces*) เป็นแอกติโนมัยซีทกลุ่มที่มีความสำคัญในด้านความสามารถในการสร้างเมตาโบไลต์ที่สำคัญ โดยส่วนใหญ่แล้วแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติมักพบว่าอยู่ในกลุ่มนี้ (รัตนกรณ, 2548) โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในจีนัส *Streptomyces* นี้มักผลิตสารสีได้ โดยสารสีชนิดต่างๆ มักจะอยู่ที่บริเวณ vegetative mycelia และ aerial mycelia (Holt et al., 1994) สเตรปโตมัยซีทส่วนใหญ่จะมีหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร (Saprophytes) แต่บางชนิดก็เป็นพาราไซต์ในพืชและสัตว์ นอกจากนี้สปอร์ของสเตรปโตมัยซีทมีผนังเซลล์ที่หนา และมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงสามารถทนทานอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีกว่าเส้นใย และที่ผิวสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทมักมีประจุลบ ยกเว้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่อนข้างจะเป็นกรด (รัตนารณ, 2548)

ลิปิด เป็นโมเลกุลที่มีความแตกต่างหลากหลาย และมีหน้าที่ทางชีวภาพที่กว้างขวาง หน้าที่หลักของลิปิด คือการสร้าง lipid bilayer ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณที่มีการซึมผ่านของสารเพื่อเข้าออกเซลล์ โดยปกติแล้ว Diacylglycerol glycols เป็นส่วนประกอบหลักในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะมี Saccharolipid (Lipid A) เป็นโครงสร้างหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ (Klanbut, 2013) และที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ยังมี Cardiolipin เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์แอคติโนมัยซีท และเอนไซม์ Cardiolipin synthase เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ใน *Streptomyces* และในแอคติโนมัยซีท และจะพบได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียทั่วไป Cardiolipin และไขมัน มีความเกี่ยวข้องกับชีวเซลล์และการเจริญเติบโตของ แอคติโนมัยซีทใน *Streptomyces* (Flardh, 2010)

แบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่ใช้ในการผลิตสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นมานั้นจะเป็นสารกลุ่มที่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Sharma, 2011) โดยในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท เช่น *Streptomyces lavendulae* ใช้ผลิต formycin, *S. griseus* ใช้ผลิต streptomycin, *S. coelicolor* ใช้ผลิต actinorhodin, *S. antibioticus* ใช้ผลิต actinomycin, *Saccharopolyspora erythraea* ใช้ผลิต erythromycin, *Amycolatopsis orientalis* ใช้ผลิต vancomycin (Abdelomohsen *et al.*, 2015) โดยในสภาวะที่มีอาหารอยู่อย่างจำกัด แบคทีเรียจะมีการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นโดยแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่จะมีเป้าหมายในการยับยั้งการสังเคราะห์ peptidoglycan ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่น หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่นแตก (Klanbut, 2013) เพราะเหตุนี้จึงสามารถที่จะพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมแบบ extreme เนื่องจากแอคติโนมัยซีทจะต้องทำการพัฒนาและปรับตัวให้สามารถดำรงอยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆได้ เช่นการสร้างเอนไซม์และการสร้างสารปฏิชีวนะ (Ballav *et al.*, 2014)

จากความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กล่าวไปข้างต้น ทำให้เกิดความสนใจในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ โดยจะมุ่งเน้นศึกษาฟอสโฟลิปิดที่พบในบริเวณเยื่อหุ้มเอกซาร์นี้เป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกซาร์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของแอกติโนมัยซีท โดยทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทชนิดที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จากดินป่าชายเลนอำเภอบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และทำการสกัดหยาบด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Klanbut, 2013) จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar disc diffusion (Ballav *et al.*, 2014) ซึ่งอาจทำให้สามารถค้นพบแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อทำการศึกษาคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากแหล่งดินป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และจากแหล่งดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา
2. เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถทำการคัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาการทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์บางชนิด จากแอกติโนมัยซีทที่สามารถทำการคัดแยกได้
4. เพื่อทำการศึกษาคัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแอกติโนมัยซีท โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ในการตรวจวิเคราะห์

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีท จากดินป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และจากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา เพื่อศึกษาฟอสโฟลิปิด และการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ โดยทำการคัดแยกเชื้อด้วย Enriched Media คือ International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) ที่เติม Nystatin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อาหาร 100 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อที่บริสุทธิ์ในหลอดอาหารเลี้ยง ISP2 ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งทางชีวภาพจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีท ด้วยวิธี Agar disc diffusion และทำการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นทำการศึกษา และวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท จากแหล่งดินป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และจากแหล่งดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา
2. สามารถจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทได้
3. สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถทำการคัดแยกได้
4. สามารถทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีท เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้
5. สามารถทำการสกัดสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแอคติโนมัยซีทได้
6. งานวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบางชนิด และสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปผลิตยาปฏิชีวนะในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

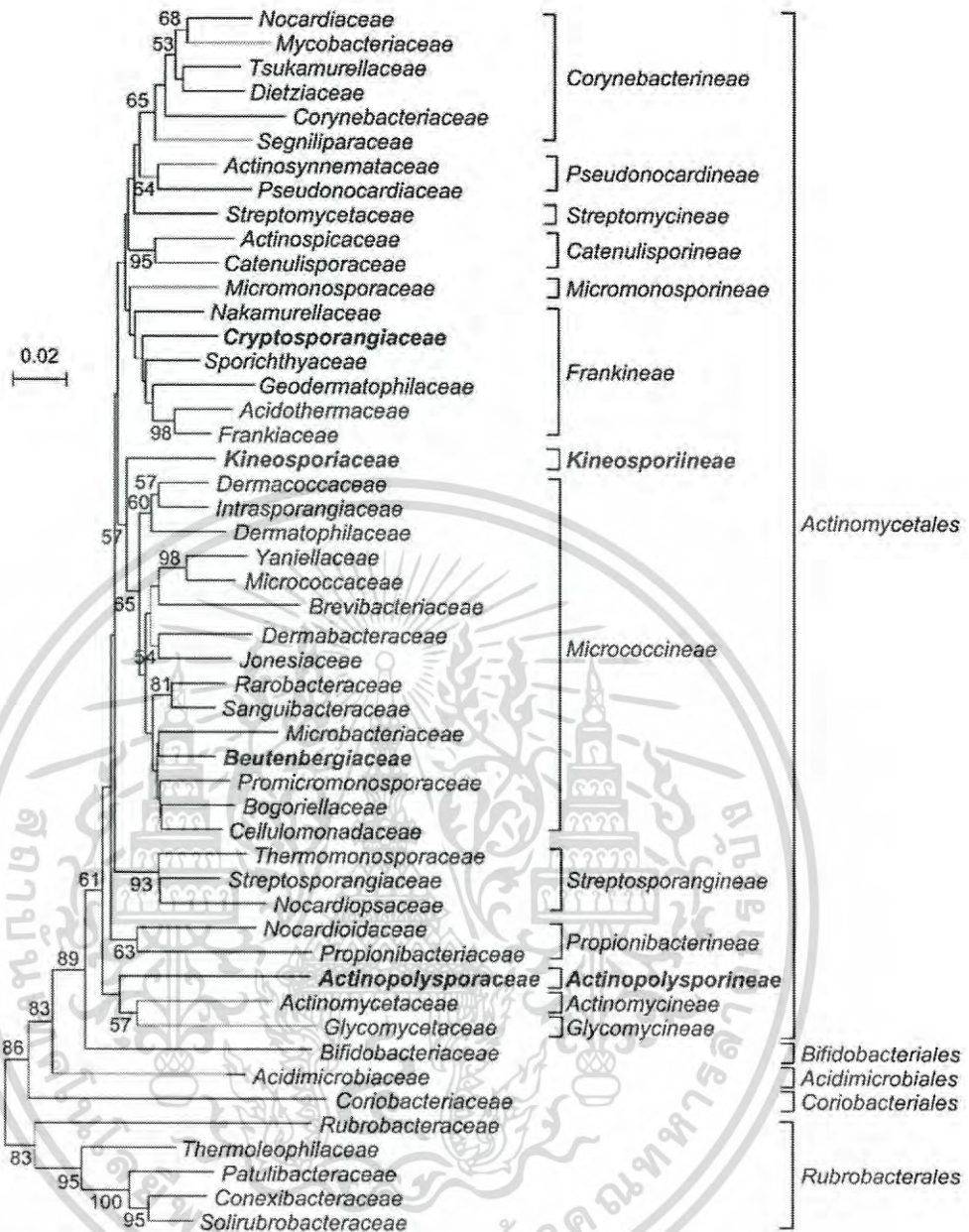
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีท (Actinomycetes) คือสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา เนื่องจากแอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเส้นใยได้ ประกอบด้วย เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) แอกติโนมัยซีทต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นตรงที่ลักษณะโคโลนีจะมีลักษณะเป็นผงคล้ายกำมะหยี่ หรือหนังสัตว์ และไม่มีลักษณะมันวาว นอกจากนี้ค่า G+C content จะมีค่ามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น (รัตนารณ, 2548) Zhi และคณะ (2009) แบ่งแอกติโนมัยซีท ซึ่งอยู่ในออร์เดอร์ *Actinomycetales* ได้ทั้งหมด 13 suborders ได้แก่ *Corynebacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Catenulisporineae*, *Micromonosporineae*, *Frankineae*, *Kineosporiineae*, *Micrococcineae*, *Streptosporangineae*, *Propionibacterineae*, *Actinopolysporineae*, *Actinomycineae* และ *Glycomucineae* ดังแสดงใน รูปที่ 2.1

แบคทีเรียเส้นสายกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ในดินไม่มีอันตราย มีน้อยชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับคน สัตว์ และพืช อยู่ในดินเป็นแซโพโรไฟต์ และเคโมออแกโนโทรฟ ช่วยย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ นอกจากนี้บางชนิดยังผลิตสารปฏิชีวนะใช้รักษาในคน และบางชนิดยังสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจน ให้กับพืชชั้นสูงบางชนิดอีกด้วย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท มักเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรคในคน มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ก่อโรคในมนุษย์ และมักเป็นแอกติโนมัยซีท ในจีนัส *Nocardia* เช่น โรคโนคาร์ดิโอซิสที่หลอดลมและปอด (bronchopulmonary nocardiosis) ที่เกิดจากเชื้อ *N. asteroides* โรคโนคาร์ดิโอซิสที่ผิวหนัง (cutaneous และ subcutaneous nocardiosis) ที่เกิดจากเชื้อ *N. brasiliensis* และ *N. otitidiscaviarum* (อิสยา และวัชรินทร์, 2556)

แอกติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียเนื่องจาก ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย เชื้อชนิดนี้ในธรรมชาติมีบทบาทสำคัญคือเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร นอกจากนี้ยังมีความสำคัญทางการแพทย์และอุตสาหกรรม โดยเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น สารปฏิชีวนะ และสารที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เอนไซม์ และวิตามิน (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.1 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทใน Order Actinomycetales ด้วย phylogenetic tree (Zhi et al., 2009)

## 2.2 การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีท

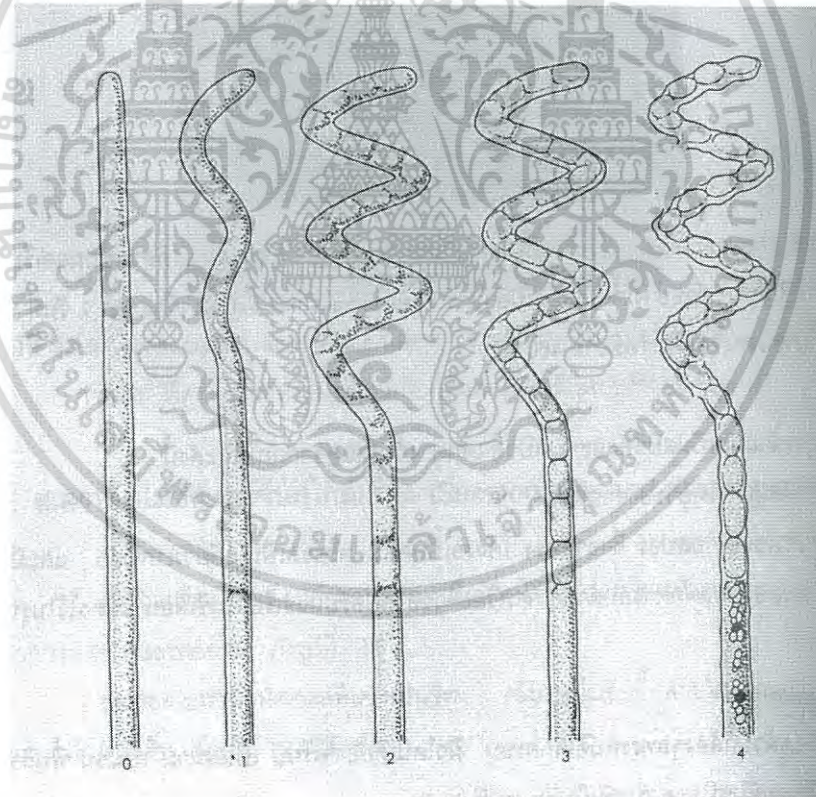
แอกติโนมัยซีทมักมีลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ complex colony เนื่องจากเกิดการสร้าง arthospores โดยแอกติโนมัยซีทพวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้จะถูกจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และสกุล *Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya* และ *Streptovercillium* (Hodgson, 2000) การรวมตัวของเส้นใยที่แอกติโนมัยซีทสร้างขึ้นทำให้เกิดเป็นโคโลนี การเกิดโคโลนีใหม่อาจเกิดจากเพียงแค่ 1 สปอร์หรือ 1 ท่อนของเส้นใยก็สามารถเจริญเป็นโคโลนีใหม่ได้ (รัตนภรณ์, 2548)

ยกตัวอย่างเช่น การสร้างโคโลนีของ *Streptomyces carpinesis* เริ่มจาก 2 วันแรกในการบ่มเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแอกติโนมัยซีทจะมีการสร้าง hyphae ขึ้นทั้งบริเวณพื้นผิวแล้วในชั้นอาหาร เมื่อครบ 3 วันเส้นใยต่างๆจะเริ่มมีการแตกกิ่งก้านสาขามากขึ้น โดยที่บริเวณบนสุดของโคโลนี substrate mycelium จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น aerial mycelium ส่วน substrate mycelium ที่อยู่ใต้ผิวอาหารจะเจริญลึกลงไป เมื่อห้าวันผ่านไปจะเริ่มมีการสร้าง spore chains ทั้งที่บริเวณ substrate mycelium และ aerial mycelium (Miguel et al., 1997)

### 2.3 การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีท

สปอร์เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้แอกติโนมัยซีทสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีทสามารถสร้างได้หลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนมัยซีทนั้นๆ เช่น การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces coelicolor* ที่ขึ้นอยู่กับ *Streptomyces* spore wall synthesizing complex (SSSC) ที่บรรจุโปรตีนที่มีความจำเพาะอยู่ภายในที่มีความสำคัญในการสร้างผนังของสปอร์ที่เป็น glycopolymers (Sigle et al., 2014) ลักษณะการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces coelicolor* แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์ของ *Streptomyces coelicolor* (0) ไฮฟาของแอกติโนมัยซีท (1) ไฮฟาที่สร้างสปอร์จะแบ่งเป็นเซลล์ยาวโดยสร้างผนังกันและที่ปลายไฮฟาจะเริ่มเกิดการขด (2) ที่ปลายไฮฟาจะแบ่งเป็นห้องๆโดยมีการสร้างผนังกันขึ้น (3) ผนังเซลล์จะหนาขึ้น และเกิดการคอดเข้ามาเป็นสปอร์ (4) เมื่อสปอร์เจริญเต็มที่ที่จะแยกตัวออก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทั่วไปของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทแบบต่างๆ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

- 1) สปอร์ที่ถูกสร้างขึ้นเดี่ยวๆ (monosporous) การเกิดสปอร์แบบนี้มักเริ่มที่ปลายเส้นใยมีการขยายขนาดขึ้น
- 2) สปอร์ที่ต่อกันเป็นเส้นสาย การสร้างสปอร์แบบนี้มักพบในแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ โดยสปอร์ชนิดนี้เกิดจากการสร้างเส้นใยกันขึ้นในแต่ละห้องเพื่อเปลี่ยนให้แต่ละห้องนั้นกลายเป็นสปอร์
- 3) สปอร์ที่อยู่ภายในอับสปอร์ โดยอับสปอร์ที่สร้างสปอร์จำนวนมากอยู่ภายในเรียกว่า polysporous sporangia (รัตนารณ, 2548)

## 2.4 นิเวศวิทยาของ Actinomycetes

Actinomycetes เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามดิน โดยทั่วไปแล้วจะพบได้ตามผิวน้ำดินหรือลึกลงไปดินไม่เกิน 4 เซนติเมตร ในดินที่มีสภาพความเป็นด่างที่พีเอช 6.6 - 8 จะพบแอคติโนมัยซีทได้สูงถึง 95 % ของจุลินทรีย์ที่พบในดินทั้งหมด (กิงจันท์, 2555) โดยแอคติโนมัยซีทจีนัส *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่พบได้มากที่สุด และมักมีการแพร่กระจายทั้งระบบนิเวศทั้งบนบกและในน้ำ ส่วนใหญ่แล้วเป็นพวก sporophytes หรือผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร แต่ยังมีบางชนิดที่สามารถก่อโรคได้กับพืชและสัตว์ (รัตนารณ, 2548) นอกจากนี้ในดินแล้ว สภาวะแวดล้อมทางทะเลก็ยังสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้ มีรายงานว่าแอคติโนมัยซีท 9% จากทั้งหมดสามารถแยกได้จากแหล่งต่างๆตามทะเล เช่น ตะกอน ผิวน้ำหรือปะการัง โขดหิน หรือแม้กระทั่งดินที่ก้นมหาสมุทร ที่มีการค้นพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิต non-ribosomal polyketides synthase (NRPS) และ polyketide synthase (PKS) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่มีความสำคัญ (Manivasagan *et al.*, 2013) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทจะเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารในระบบนิเวศแล้ว ยังมีงานวิจัยที่พบแอคติโนมัยซีทจีนัส *Streptomyces* บางชนิดที่แยกได้จากดินสามารถย่อยสลายสารกำจัดวัชพืชที่ชื่อว่า diuron ได้ (Castillo *et al.*, 2006)

## 2.5 ความสามารถในการเจริญของแอคติโนมัยซีท

จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ในสภาพธรรมชาติ แต่แอคติโนมัยซีทมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงพบแอคติโนมัยซีทมีจำนวนเพิ่มขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีจำนวนลดลงแล้ว สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีทคือสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง เป็นต้น (งามนิจ, 2547)

## 2.6 แอคติโนมัยซีท genus *Streptomyces*

เป็นแอคติโนมัยซีทจี้นส์ที่สามารถพบได้มากที่สุด โดยทั่วไปแล้วเส้นใยของแอคติโนมัยซีทจี้นส์นี้จะมีขนาด 0.5 - 2.0 ไมครอน มีการแตกกิ่งของแขนงได้มากแต่จะไม่มีมีการหักเป็นท่อนสามารถสร้างรงควัตถุได้หลายชนิดรวมทั้ง ชนิดที่สามารถแพรงอาหารได้อีกด้วย นอกจากนี้ *Streptomyces* ยังมีประโยชน์อื่นอีกมากมายเช่น สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายประเภท ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย สารต่อต้านเชื้อรา สารต่อต้านมะเร็ง สารฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง เป็นต้น *Streptomyces* ส่วนใหญ่แล้วจะไม่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ แต่ก็พบ *Streptomyces* ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรค ซึ่งพบเพียงเล็กน้อย เช่น *S. scabies* ที่ก่อโรค potato scab, *S. somaliensis* ที่ก่อโรค actinomycetoma ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ *S. albus* ที่ก่อโรคหอบหืดในคน เป็นต้น (Goodfellow *et al.*, 1988) สามารถพบแอคติโนมัยซีทจี้นส์นี้ได้ทั่วไปตามดินและซากเน่าเปื่อย (รัตนภรณ์, 2548) สามารถย่อยสลาย adenine, esculin, casein, gelatin, hypoxanthine, L-tyrosine และแบ่ง ให้ผล catalase test เป็น positive สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (Holt *et al.*, 1994) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ที่ประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส แต่มีบางสปีชีส์ชอบที่จะเจริญภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำ (psychrophilic) หรือภายใต้อุณหภูมิที่สูง (thermophilic) พีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ที่ 6.5 – 8.0 (Goodfellow *et al.*, 2012)



FIGURE 340. Straight to flexuous (*Rectiflexibles*) spore chains of *Streptomyces griseus*. Bar, 2  $\mu$ m.

รูปที่ 2.3 ลักษณะ spore chains ของ *Streptomyces griseus* เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ scanning electron microscope (SEM) (Goodfellow *et al.*, 2012)

สปอร์ของ Streptomyces สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเส้นใย เนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และมีผนังเซลล์ที่หนากว่า นอกจากนั้นผิวสปอร์ของ Streptomyces โดยมากมักมีประจุลบ ยกเว้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี pH ที่ค่อนข้างต่ำ (รัตนภรณ์, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2548) วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทจีนีส์นี้จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 3 ลักษณะ ประกอบด้วย vegetative (substrate) mycelium ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว aerial mycelium ที่มี aurospores รวมตัวกันเป็นเส้นสายหรืออาจเรียกได้ว่า sporophores และลักษณะสุดท้าย arthrospores ลักษณะของผิวสปอร์ของแอกติโนมัยซีทจีนีส์นี้มีอยู่ 3 ลักษณะโดยสังเกตได้จากการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscopy (SEM) ประกอบด้วยสปอร์ที่มีผิวเรียบ สปอร์ที่มีตุ่มขึ้นบริเวณผิว และสปอร์ที่มีผิวย่น (Goodfellow *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.4 ลักษณะการสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium ของ genus *Streptomyces* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Holt *et al.*, 1994)

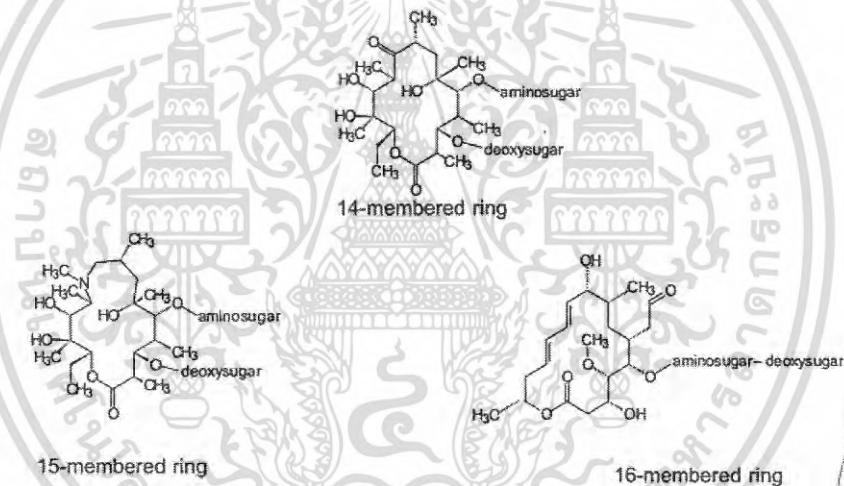
## 2.7 ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก หมายถึง ยาต้านสิ่งมีชีวิต (Anti หมายถึง ต่อด้าน Bios หมายถึง ชีวิต) ซึ่งสิ่งมีชีวิตในที่นี้คือ จุลินทรีย์ หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กๆ ซึ่งคือเชื้อโรคนั่นเอง ดังนั้น ยาปฏิชีวนะ ก็คือ ยาที่ยับยั้ง ฆ่า และ/หรือ ต้าน จุลชีพซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นเชื้อแบคทีเรีย บางคนจึงเรียกว่า ยาต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) แต่ยังคงครอบคลุมถึงเชื้อไวรัสบางชนิด และเชื้อราบางชนิดได้ด้วย ยาปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้ออกเป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ Penicillin Aminoglycosides Cephalosporin Macrolide Quinolones และ Tetracyclines โดย ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กับโรคติดเชื้อกลุ่ม pneumococci streptococci และ mycoplasma โดยจะเป็น drug of choice สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ *Legionella* และ *Chlamydia* ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้เช่น ยาอิริโทรมัยซิน (erythromycin) ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท *Streptomyces erythreus* ยาปฏิชีวนะพวก macrolide อาจแบ่งกลุ่มยาได้ตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในวงแหวน เช่น 12 14 15 หรือ 16 อะตอม หรืออาจแบ่งตามจำนวนและชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างหลักทางเคมีของยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ คือ macrocyclic lactone ring หรือวงแหวน macrolide (macrolide ring) และหมู่ น้ำตาล aminosugar หรือ deoxy sugar

เอกสารนี้เผยแพร่โดยศูนย์ส่งเสริมการเรียนรู้ทางวิชาการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะมีกระบวนการทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยมักจะมีเป้าหมายในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ส่งผลให้ความสมดุลของแรงดันในเซลล์แบคทีเรียนั้นเปลี่ยนไป และตายในที่สุด นอกจากนั้นยาปฏิชีวนะบางชนิดยังยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Cell wall) ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียนั้นไม่สามารถแบ่งตัว จึงหยุดการเจริญเติบโต และสารปฏิชีวนะบางชนิดยังยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ของแบคทีเรีย ทำให้ไม่สามารถผลิตรุ่นลูกหลานมาทำอันตรายต่อ host ได้อีกต่อไป (อภัย, 2557) สำหรับยาปฏิชีวนะกลุ่ม macrolides มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย กลไกการออกฤทธิ์คือ ยาจะแทรกซึมผ่านเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย และจะจับกับ 50S ribosome subunit จึงสามารถยับยั้งการ translocation ของ aminoacyl transfer-RNA ที่มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน (ครารวรรณ และ จันคณา, 2547)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างหลักของยาปฏิชีวนะ macrolides กลุ่มต่างๆ (ครารวรรณ และ จันคณา, 2547)

## 2.9 Secondary metabolites ใน actinomycetes

แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งสำคัญของสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และประมาณ 75 % ของสารทุติยภูมิที่พบในเชื้อจีนีสน์มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค (Boudemagh *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า rare actinomycetes สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและรา โดยเฉพาะสกุล *Micromonospora*, *Actinomadura* และ *Streptosporangium* (Boudemagh *et al.*, 2005) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีท 27 สายพันธุ์จากดินที่เก็บได้จากบริเวณทิศตะวันออกของประเทศแอลจีเรียพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* UMIP 48.72, *C. albicans* UMIP 884.65, *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Aspergillus fumigates* UMIP 1082.74, *Aspergillus niger* ATCC 16404 และ *Fusarium oxysporum* UMIP 625.72 โดยใช้วิธี agar diffusion method สารที่เป็น Secondary metabolites คือสารที่ถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่แบคทีเรียไม่มีการเจริญ หรือในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย เช่น สภาวะที่มีปริมาณของเชื้อแข่งขันสูง แอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อที่ได้รับการรู้จักกันอย่างกว้างขวางว่าสามารถที่จะผลิต natural product ได้หลากหลาย (Abdelmohsen *et al.*, 2015) การผลิตสารทุติยภูมิในแอคติโนมัยซีทที่มีการผลิตเอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆแสดงใน ตารางที่ 2.1

Blanco และคณะ (2007) พบว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินที่ใช้ในการเพาะปลูกในสวนแตงโมสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นสารปฏิชีวนะได้

Govindarajan และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนเพื่อหาแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ผลปรากฏว่าแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ *Streptomyces longispororuber* ที่คัดแยกได้สามารถผลิตสารต้าน methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้

Bizuye และคณะ (2013) ได้ทำการทดลองคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ จากดินที่เมือง Gondar ประเทศ North West Ethiopia โดยทำการเก็บตัวอย่างดินมาทำการเจือจาง และทำการ spread plate ลงบนอาหาร starch casein agar และ oat meal agar ที่มีการเติม amoxicillin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและ cyclohexamide เพื่อยับยั้งการเจริญของรา จากนั้นนำแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิค agar disc diffusion ผลปรากฏว่ามีอยู่ 3 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ ประกอบด้วย *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, และ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains 2 และ 4 (MRSA2 และ MRSA4)

Singh และคณะ (2012) ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ต้านยาแบบ multidrug resistant bacteria จากตัวอย่างดินที่หลากหลาย โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จะถูกเก็บไว้ใน agar slants และ glycerol stocks และนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบการสร้างสารปฐมภูมิเช่น สารปฏิชีวนะเป็นต้น จากการทดลองพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียก่อโรคประกอบด้วย *Escherichia coli* (*E.coli*), Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ Vancomycin-Resistant *Enterococci* (VRE)

Valam และคณะ (2012) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินที่ Western Ghats ประเทศ Tamil Nadu ด้วยอาหาร starch casein agar ที่เติม supplement ที่ประกอบด้วย acitidone และ nalidixic acid พบว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกได้สามารถผลิตสารต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ ประกอบด้วย *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*K. pneumoniae*, *Xanthomonas* sp., *S. typhi*, *V. fischeri* และ *P. vulgaris* และสามารถต้านเชื้อรา *Aspergillus niger*

ตารางที่ 2.1 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ (รัตนภรณ์, 2548)

สารปฏิชีวนะ	แอกติโนมัยซีทที่ผลิต
Ankingomycin	<i>Streptomyces</i> sp.SF2587
Antimycin A1	<i>Streptomyces</i>
Benanomycin A R=OH	<i>Actinomyceshibisca</i> , <i>Actinomyces spadix</i>
Blemycin A2	<i>Streptomyces verticillus</i>
Cholropolysporins B and C	<i>Saccharopolysporainterjecta</i> SANK 60983
Cyclothialidine	<i>Streptomyces filipnesis</i> NR 0484
10-Demethoxystreptonigrin	<i>Streptomyces otagonesis</i> SANK 62589
Deoxylaidlomycin	<i>Streptomyces eurocidicus</i> SANK
Esperamicin A1	<i>Actinomadura verrucosospora</i>
FK 506 (Tacrolimus)	<i>Streptomyces sukubaensis</i> No 9993
Hatomamicin A	<i>Saccharopolyspora</i> sp. YL-0358M
Herbimycin A R1 = OCH <sub>3</sub> , R2=CH <sub>3</sub>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> AM-3672
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Isohematinic acid	<i>Actinoplanes philippinensis</i> SANK 61681
Pyrralomycin A	<i>Streptomyces vitaminophilus</i>
Mathystatin	<i>Actinomadura atramentaria</i> SANK 61484
Mildiomycin	<i>Streptomyces rimofaciens</i> B-98891
Mycinamicin II	<i>Micromonospora griseorubida</i> A 11735
Streptomycin	<i>Streptomyces rimofaciens</i> B-98891
Vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
Sporaviridin A1	<i>Kutzneriaviridogrisea</i>
Thiazohalostatin	<i>Actinomadura emaduriae</i> HQ 24
Triacsin	<i>Streptomyces</i> sp. SK-1894
Tylosin A	<i>Streptomyces fradiae</i> A-974

นอกจากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินแล้ว แอกติโนมัยซีทที่แยกจากสภาวะแวดล้อมทางทะเลก็สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่เป็นสารปฏิชีวนะได้เช่นกัน โดยมักจะแยกแอกติโนมัยซีทได้จากสภาพแวดล้อมทางทะเลที่เป็น ตะกอน ฟองน้ำ หรือแม้กระทั่งที่ผิวของสัตว์ทะเลบางชนิด สารที่เอกลำนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมทางทะเล แสดงตารางที่ 2.2 (Zotchev, 2012)

ตารางที่ 2.2 สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล (Zotchev, 2012)

Compound (chemical classis)	Activity (mode of action)	Isolate
Abyssomycin C	Antibacterial	<i>Vernucostspora</i> sp.
2-Alltoxyphenol	Antibacterial Antioxidant	<i>Streptomyces</i> sp.
Allbidopyrone	Cytoxic	<i>Streptomyces</i> sp.
Caboxamycin	Antibacterial Cytoxic	<i>Streptomyces</i> sp.
Clycloenarines	Antinflammator	<i>Streptomyces</i> sp.
Dermacozines	Cytoxic Radical scavenging	<i>Dermacoccus</i> sp.
Diazepinomicin	Anticancer	<i>Micromonospora</i> sp.
Enterocin	Antibacterail	<i>Streptomyces maritimus</i>
ML-449 (Macro lactam)	Cytoxic	<i>Streptomyces</i> sp.
Proximicins	Cytostatic	<i>Vernucostspora</i> sp.

จากตารางที่ 2.1 และ 2.2 จะเห็นได้ว่าแอกติโนมัยซีทมีความหลากหลายในการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่ปัจจุบันมีเพียงสารปฏิชีวนะบางชนิดเท่านั้นที่มีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากสารปฏิชีวนะชนิดที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้ คือจะต้องมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์สูง แต่ในขณะเดียวกันต้องเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์น้อยที่สุด ถึงจะเป็นสารปฏิชีวนะที่มีคุณค่าต่อการรักษา (รัตนภรณ์, 2548) เพราะเหตุนี้จึงต้องทำการศึกษาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่อยู่ตลอดเวลา

## 2.10 Rare actinomycetes

Rare actinomycetes หรือ non-streptomycetes (NSA) คือแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์หายาก โดยแอกติโนมัยซีทกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะอย่างจำเพาะ จึงมีความสำคัญในการนำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ (Tiwari and Gupta, 2014) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า Rare actinomycetes บางชนิดสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช และเป็นตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมทางชีวภาพในการต้านเชื้อราในดินดังแสดงในรูปที่ 2.6 (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006)

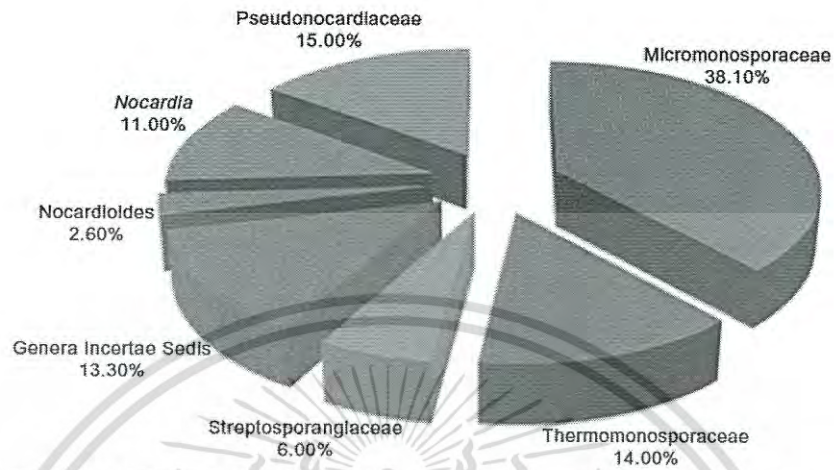


FIGURE 1 Relative distribution of producing strains among rare actinomycetes (according to the recent classification published in the Atlas of Actinomycetes Japan) [10,25].

รูปที่ 2.6 Rare actinomycetes สายพันธุ์ต่างๆที่ค้นพบ ที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Tiwari and Gupta, 2014)

ตารางที่ 2.3 สารปฏิชีวนะชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยแอคติโนมัยซีทกลุ่มหายาก (Rare actinomycetes) (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006)

Producing species	Antibiotic	Reference
<i>Actinoplanes</i> sp.	Xanthene	Cooper <i>et al.</i> (1992)
<i>Actinoplanes</i> sp.	Sch 54445	Min <i>et al.</i> (1997)
<i>A.caeruleus</i>	Heptacne	Palleroni (1989)
<i>A.deccanensis</i>	Lipiamycin	Palleroni (1989)
<i>A.lanthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>A.missourlensis</i>	5-azaxytidine	Palleroni (1989)
<i>A.philippinensis</i>	Maccrocyclic Lactone	Palleroni (1989)
<i>A.wtahensis</i>	Echinocoundin	Boeck <i>et al.</i> (1989)
<i>Actinomadura hibisca</i>	Pradimicin FA-1	Sawada <i>et al.</i> (1990)
<i>Microbispora</i> sp.	SCH 31828	Patel <i>et al.</i> (1998)
<i>Microbispora</i> sp.	Glucosylquestiomycin	Igarachi <i>et al.</i> (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Spatanamycins	Nair <i>et al.</i> (1992)
<i>Micromonospora</i> sp.	Rustmicin	Sigmund and Hirseh (1998)

ตารางที่ 2.3 สารปฏิชีวนะชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยแอคติโนมัยซีทกลุ่มหายาก (Rare actinomycetes) (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006) (ต่อ)

Producing species	Antibiotic	Reference
<i>Micromonospora</i> sp	Micromonosporin	Thawai <i>et al.</i> (2004)
<i>Micromonospora coerulea</i>	Glutarimide	Boomscoek <i>et al.</i> (1999)

### 2.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion (Ballav *et al.*, 2014)

การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสารซึ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้งจะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (sterile swab) ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ แล้วทา (swab) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหายาก ที่มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบรองนึ่ง จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทาเชื้อเอาไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร

### 2.12 ฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีท และแบคทีเรียทั่วไป

ฟอสโฟลิปิดเป็นส่วนประกอบสำคัญที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ของแบคทีเรีย เยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ในการป้องกันแรงดันออสโมติกจากภายนอก และเป็นบริเวณที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด 20 - 30% โปรตีน 60 - 70% ฟอสโฟลิปิดเป็นเยื่อ 2 ชั้น โดยหันส่วนที่ไม่ละลายน้ำเข้าหากัน และหันส่วนที่ละลายน้ำออก นอกจากนั้นยังมีโปรตีนฝังอยู่ในชั้นฟอสโฟลิปิด เรียก อินทีกรัลโปรตีน (integral protein) ส่วนโปรตีนชนิดอื่นๆ จะยึดอยู่หลวมๆด้านนอกของฟอสโฟลิปิด เรียก เพอริเฟอรัลโปรตีน (peripheral protein) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557) สำหรับฟอสโฟลิปิดที่พบในเชื้อแอคติโนมัยซีททั่วไป ประกอบด้วย phosphatidyl inositol, phosphatidyl inositol mannosides, phosphatidylmethylethanolamine, acyl phosphatidyl glycerol (APG) และ diphosphatidyl glycerol (DPG) เป็นต้น นอกจากนั้นแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดยังมีฟอสโฟลิปิดที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น Phospholipid type PI (no nitrogenous phospholipids) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้เนาไปเผยแพร่บนงานวิชาการใดๆ ไม่ว่าจะโดยใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่พบในจีโนม *Actinomadura (madurae, pelletieri)*, *Corynebacterium*, *Microtetraspora* และ *Nocardioides* Phospholipid type PII ที่ประกอบด้วย nitrogenous phospholipid และ phosphatidyl ethanolamine ที่พบในแอคติโนมัยซีทจีโนม *Actinoplanes*, *Chainia*, *Dactylosporangium*, *Microellobosporia*, *Micromonospora*, *Micropolyspora (brevicatena)*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* Phospholipid type PIII ที่ประกอบด้วย characteristic phospholipid และ phosphatidyl choline พบในจีโนม *Actinomadura (dassonvillei)*, *Micropolyspora (faeni)*, *Nocardia (autotrophica)* และ *Pseudonocardia* Phospholipid type PIV ที่ประกอบด้วย phospholipid ที่บรรจุ glucosamine (GluNU) พบในจีโนม *Intrasporangium*, *Microbispora* และ *Streptosporangium* Phospholipid type PV ที่ประกอบด้วย phosphatidyl glycerol และ GluNU พบในจีโนม *Promicromonospora* และ *Oerskovia* (Lechevalier et al., 1977)

### 2.13 จุลินทรีย์ในดินและแอคติโนมัยซีทในดินป่าชายเลน

ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ประกอบด้วย ชนิดและปริมาณของสารอาหาร การระบายอากาศ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น เป็นต้น จุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในดินคือ แบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน แบคทีเรียในดินมีทั้งออโตโทรฟ เฮเทอโรโทรฟ มีโซไฟล์ เทอร์โมไฟล์ ไฮโครไฟล์ แอโรบ และแอนแอโรบ แบคทีเรียที่พบในดินยกตัวอย่างเช่น *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* และ *Agrobacterium* นอกจากนี้ยังพบ *Actinomycetes* ชนิดที่สำคัญ ยกตัวอย่างเช่น *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* นอกจากนี้ยังพบรา ยกตัวอย่างเช่น *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicilium* และ *Mucor* สาหร่าย เช่น *Chlamydomonas*, *Chlorococcum* และไดอะตอม นอกจากนี้ยังพบโพรโตซัว และไวรัสอีกด้วย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557)

Kafilzadeh และ Dehdari (2015) พบว่าการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน ในช่วงฤดูใบไม้ผลิ พบเชื้อแอคติโนมัยซีทมากกว่าในหน้าร้อน นอกจากนั้นแอคติโนมัยซีทจีโนมที่พบมากที่สุดคือจีโนม *Streptomyces* ค่าพารามิเตอร์ของดินที่เหมาะสมสำหรับการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน ได้แก่ อุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.6 และค่าความเค็มของดิน 5 ppt และยังมีแร่ธาตุสำคัญอีกหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น potassium, phosphorus, silicon, zirconium, rubidium, niobium, caesium, lanthanum, barium, cerium และ thorium (Baskaran et al., 2015)

## 2.14 เชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ

*Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ มักพบในดินที่มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรต และโพลีแซคคาไรด์ *Bacillus* เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe *B. Subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) ที่ทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี แบคทีเรียแกรมบวกชนิดนี้สามารถใช้สารอาหารได้หลายชนิดเนื่องจากมีเอนไซม์ที่หลากหลาย *B. subtilis* สามารถใช้ ammonium, nitrate, amino acids, some purines, urea, uric acid, allantoin และ peptides เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Vos *et al.*, 2009)

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์เป็น facultative anaerobe เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้คน และสัตว์ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557) *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียในทารกที่ระบาดในสถานรับเลี้ยงเด็ก ดังนั้นจึงจัด *E. coli* ชนิดที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียให้อยู่ในกลุ่ม enteropathogenic *E. Coli* (ECC) โรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม ECC สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ Enterotoxic type คือกลุ่มที่ผลิตสารพิษ enterotoxin ที่บริเวณลำไส้เล็กตอนบนทำให้เกิดอาการท้องเสียคล้ายอหิวาตกโรค และ Invasive type ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด โดยเชื้อจะเจริญในลำไส้ใหญ่ และแทรกตัวไปที่ epithelial cell ของลำไส้ ทำให้เกิด shigellosis-like illness (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับสมาคมผู้ค้าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและอาหารเยือกแข็งแห่งประเทศไทย, 2534) *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสแล้วเกิดกรด และก๊าซในเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียชนิดนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นดัชนีสุขาภิบาล สำหรับการบ่งบอกการปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและเครื่องดื่ม และยังเป็นแม่แบบสำหรับการศึกษาค้นคว้าทางด้านพันธุวิศวกรรม (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญคือ การทดสอบ indole และ methyl red (MR) ให้ผลลบ ส่วนผลการทดสอบ VogesProskauer (VP) และ citrate ให้ผลลบ ไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H<sub>2</sub>S) ไม่มีเอนไซม์ urease และ phenylalanine deaminase (Brenner *et al.*, 2005)

*Micrococcus luteus* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram-positive bacteria) รูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) การแบ่งเซลล์แบบ binary fission ของแบคทีเรียวงค์นี้ จะเกิดการแบ่งมากกว่าหนึ่งแนวทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มไม่สร้างสปอร์สร้างเม็ดสี (pigment) ได้ ทำให้มีสีต่างๆ เช่น สีชมพู สีแดง สีส้มมี metabolism แบบ respiratory คืออาศัยปฏิกิริยา oxidative ในการเปลี่ยนสารประกอบคาร์บอนเป็นน้ำ และพลังงาน สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดได้ เป็นแบคทีเรียกลุ่มแซโพโรไฟต์ ไม่ก่อโรค มักอยู่ในดิน น้ำจืด อาจพบตามผิวหนังคน หรือสัตว์ (นงลักษณ์ และปรีชา,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2557) *M. luteus* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) ได้หลายประเภท โดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น นม ไข่ และเนื้อสัตว์ (Holzapfel, 1995)

*Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง aerobic เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Pseudomonadaceae* สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว ชนิดโมโนไทรคัส ปกติจะพบกระจายอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน *P. aeruginosa* ให้รงควัตถุสีฟ้าไพโอไซแอนิน (pyocyanin) และไพโอเวอดิน (pyoverdine) ซึ่งเป็นรงควัตถุฟลูออเรสเซนต์ที่ละลายน้ำ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557) *P. aeruginosa* บางสายพันธุ์สร้างชั้นเมือกอยู่ภายนอกเซลล์มีลักษณะคล้ายแคปซูล เรียกว่า surface slime เชื้อสร้างพลังงานโดยผ่านกระบวนการออกซิเดชัน และเจริญเติบโตได้เข้าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยจะใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายแทนออกซิเจน (Brenner et al., 2005) *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล แหล่งของเชื้ออาจมาจากสิ่งแวดล้อมต่างๆภายในโรงพยาบาล เช่น อุปกรณ์ทางการแพทย์ โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้น เช่น อ่างล้างมือ น้ำกลั่น น้ำเกลือ รวมถึงน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี 5 - 10 % สามารถตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้ในระบบทางเดินอาหารและทางเดินหายใจตอนบน และจะมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน โรคติดเชื้อจากเชื้อชนิดนี้ที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อบริเวณบาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ปอดบวม (hospital acquired pneumonia) และการติดเชื้อบริเวณแผลกดทับ เป็นต้น (อิสยา และวัชรินทร์, 2556)

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) ที่สำคัญมักพบในอาหาร แบคทีเรียชนิดนี้ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) อยู่รวมกันเป็นพวงคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming bacteria) ไม่เคลื่อนไหว ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล (นงลักษณ์ และปรีชา, 2557) อาหารที่ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* นี้แสดงว่าอาหารหรือผลิตภัณฑ์นั้น เกิดการปนเปื้อนเชื้อจากผิวหนัง ปาก จมูก ของผู้ที่สัมผัสอาหารโดยเฉพาะผู้ที่มีแผลเป็นหนองที่มือ หรือแขน ถ้าพบเชื้อชนิดนี้จำนวนมาก แสดงว่าการควบคุมทางสุขาภิบาลและการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการผลิตไม่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังแสดงว่าอาหารนั้นไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เพราะว่ามีโอกาสที่จะมี *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับสมาคมผู้ค้าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและอาหารเยือกแข็งแห่งประเทศไทย, 2534) ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* ประกอบด้วย โปรตีนที่ผนังเซลล์ (cell wall protein) เอนไซม์ และสารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exotoxin) โดยสามารถแบ่งสารพิษออกเป็น 4 ชนิด ประกอบด้วย staphylococcal enterotoxin เป็นสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ชนิดทนความร้อน toxic shock syndrome toxin-1; TAAT-1 พบในเชื้อ *S. aureus* ที่อาศัยอยู่ในช่องคลอด exfoliative toxin เป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ทำลายผิวหนังชั้นกำพวด

ให้หลุดออกไป และ cytolytic toxin เป็นกลุ่มของสารพิษมาภายนอกเพื่อทำลายเซลล์ร่างกายไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. aureus* เช่น การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและบาดแผล (skin and wound infection) เช่น ฝี กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กลุ่มอาการผิวหนังกำพริบหลุดลอก กลุ่มอาการช็อกที่เกิดจากสารพิษ การติดเชื้ออื่นๆ เช่น โรคปอดบวม โรคติดเชื้อในกระแสเลือด ไช้กระดูกอักเสบ ไช้ข้ออักเสบ (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) ผลการทดสอบทางชีวเคมีให้ผลการทดสอบ alkaline phosphatase, catalase, coagulase, heat-stable nuclease, hemolysis และ hyaluronidase เป็นบวก และให้ผล oxidase,  $\beta$ -galactosidase และ  $\beta$ -glucuronidase เป็นลบ (Vos *et al.*, 2009)

*Candida albicans* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่ง เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ผิวด้านหน้าโคลนเรียบหรือขุ่น มักจะทำให้เกิดโรคฉวยโอกาสทางช่องปาก และหลอดอาหาร กับผู้ป่วยที่เป็นโรค malignant tumours, lukaemia และ diabetes (Okada, 2013 ; Renna, 2015)

## 2.15 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

วิธีการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะมีวิธีที่หลากหลาย สามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ตัวอย่างวิธีการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ เช่น ในงานวิจัยของ Vengadesh และคณะ (2011) ได้ใช้วิธี Crowded plate technique ในการคัดเลือกเชื้อ โดยวิธีนี้จะใช้หาจุลินทรีย์ในดินที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทำได้โดยการนำสารละลายตัวอย่างเชื้อมาทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ soyabean casein digest (SBGD) หลังจากที่ย้อมจะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะโดยสังเกตจากโคโลนีที่มีลักษณะของ clear zone

Bizuye และคณะ (2013) ใช้วิธีการ streak เชื้อแอกติโนมัยซีทลงบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหรือราที่ต้องการทดสอบ โดยอาหารที่สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบจะใช้ nutrient agar และสำหรับราจะใช้ potato dextrose agar

Messaoudi และคณะ (2015) ได้ใช้วิธี Agar piece method ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทให้เจริญบนอาหารวุ้นแล้วทำการตัดวุ้นที่มีเชื้อเจริญวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการเจริญอยู่

## 2.16 ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ

### 2.16.1 การตกตะกอน และการย่อยสลายโปรตีน ในน้ำนม

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำนม (skim milk) หากน้ำนมจากลักษณะสีขาวขุ่นเปลี่ยนเป็นลักษณะสารละลายใสไม่มีสี และมีการตกตะกอนเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม

## 2.16.2 การย่อยสลายเจลาติน (gelatin liquefaction)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลายเจลาติน โดยการใช้เอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) (นันทนา, 2539) ซึ่งสามารถทำการทดสอบได้โดย

2.16.2.1 ใช้ gelatin agar ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อบน gelatin agar และทำการทดสอบโดยใช้กรดเมอร์คิวริกคลอไรด์ (acid mercuric chloride) ราวที่อาหารเลี้ยงเชื้อ (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) หากให้ผลบวกจะสามารถพบวงใสเกิดขึ้นรอบเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยง ส่วนผลลบนั้นจะไม่มีวงใสเกิดขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากใสเป็นลักษณะขุ่นทั่วทั้งจาน

2.16.2.2 ใช้ Kohn's denatured charcoal gelatin ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อลงในหลอดที่มี denatured charcoal gelatin ในน้ำเกลือปกติ ที่มี 0.01 M แคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่ (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) หากให้ผลบวกจะมีตะกอนถ่านละเอียดตกอยู่ก้นหลอด ส่วนผลลบบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงและไม่มีตะกอนถ่านละเอียดตกอยู่ในหลอด

2.16.2.3 ใช้ Bouillon Gelatin Broth ได้โดยการเลี้ยงเชื้อลงในหลอดที่มี Bouillon Gelatin Broth แล้วนำไปแช่เย็น ซึ่งหากอาหารเกิดการแข็งตัวแสดงว่าไม่เกิดการย่อยสลายของเจลาติน แต่ถ้าหากอาหารมีลักษณะเป็นของเหลวแสดงว่ามีการย่อยสลายของเจลาตินเกิดขึ้น

## 2.16.3 การย่อยสลายไนเตรท (nitrate reduction test)

เป็นการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรต์ (nitrite) และรีดิวซ์ไนไตรต์ให้เป็นก๊าซไนโตรเจน การรีดิวซ์ของไนเตรทแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนด้วยกัน ในส่วนของขั้นตอนแรกเป็นการตรวจสอบการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรต์ หลังจากที่ยูเลี้ยงเชื้อใน Nitrate broth หรือ Nitrate agar จะทำการทดสอบการมีไนไตรต์โดยการเติม Sulfanilic acid และ  $\alpha$ -naphthylamine ลงไป รีเอเจนต์ทั้ง 2 จะทำปฏิกิริยากับไนไตรต์เกิดสารประกอบสีแดง เรียกว่า red azo dye ถ้าในขั้นตอนแรกนี้ให้ผลบวก แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไตรต์ แต่ถ้าในส่วนของขั้นตอนแรกนั้นไม่เกิดสีแดงดังกล่าว สามารถอธิบายได้สองทาง คือ ไนเตรทไม่ถูกรีดิวซ์ หรือไนเตรทถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไตรต์แล้ว และถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นแอมโมเนียหรือก๊าซไนโตรเจน ซึ่งจะทำให้ตรวจหาไนไตรต์ไม่พบ (นันทนา, 2539) ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบต่อไปว่าเป็นไปไนโตรเจน โดยการเติมผงสังกะสี (zinc dust) ลงไปใน broth หรือ agar (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นตอนที่ 2 ผงสังกะสีสามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรต์ได้ ดังนั้นถ้าไนเตรทไม่ถูกรีดิวซ์จากขั้นตอนที่ 1 และเกิดสีแดง ในการทดสอบขั้นตอนที่ 2 แสดงว่าเป็นผลลบ คือไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท และยังคงมีไนเตรทอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เกิดสีแดงจากการทดสอบในขั้นตอนแรกและไม่เกิดสีแดงเมื่อทดสอบในขั้นตอนที่ 2 แสดงว่าสามารถรีดิวซ์ไนไตรต์ต่อเป็นแอมโมเนียหรือก๊าซไนโตรเจน แสดงว่าให้ผลเป็นบวก

#### 2.16.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (amylase) (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) สามารถทดสอบได้โดยการเลี้ยงเชื้อบน inorganic salt starch agar ซึ่งมีแป้งเป็นส่วนประกอบ แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบไปด้วย อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ส่วนประกอบทั้ง 2 นี้ประกอบไปด้วย น้ำตาล D-glucose ที่ต่อกันเป็นสาย เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สามารถย่อยสลาย glycosidic bond ของแป้งทำให้ เด็กซ์ตริน (dextrin) ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลมอลโตส (maltose) และสุดท้ายน้ำตาลมอลโตสจะถูกละลายย่อยเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (นันทนา, 2539) ในส่วนของการตรวจสอบการย่อยสลายของแป้งจะตรวจสอบโดยใช้สารละลายไอโอดีนในการสังเกตผล หากให้ผลบวกจะสามารถสังเกตเห็นวงใสสีน้ำตาลเกิดขึ้นรอบบริเวณที่เชื้อเจริญและอาหารที่อยู่รอบๆวงใสจะเป็นสีน้ำเงิน ส่วนหากได้ผลลบจะไม่เกิดวงใสสีน้ำตาลเกิดขึ้นและอาหารเป็นสีน้ำเงินเข้ม



## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ

3.1.1 ตู้อบด้วยความร้อนแห้ง (hot air oven)	บริษัท MEMMERT , Germany
3.1.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	รุ่น GF-800 ยี่ห้อ AND , Japan
3.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส	รุ่น Starter 3000 ยี่ห้อ OHAUS ,USA
3.1.4 หม้อนิ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	รุ่น ES-315 ,ยี่ห้อ TOMY, JAPAN
3.1.5 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	รุ่น Vortex- genie 2, 230v-g560e บริษัท Scientific industries, USA
3.1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ	บริษัท MEMMERT , Germany
3.1.7 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	รุ่น 120 BS ยี่ห้อ Super clean, Major scientific Thailand
3.1.8 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	รุ่น 1300 ยี่ห้อ Contherm ,New Zealand
3.1.9 เครื่องไมโครเวฟ	รุ่น R-250 sharp, Thailand
3.1.10 ตู้แช่เย็น	รุ่น SYC-120P, Sanden intercool, TH
3.1.11 ตู้แช่แข็ง - 20°C	รุ่น SF-PC697 ยี่ห้อ Panasonic, TH
3.1.12 กล้องจุลทรรศน์	รุ่น CH30 ยี่ห้อ Olympus, Japan
3.1.13 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	ยี่ห้อ Gallenkamp, UK
3.1.14 เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน	ยี่ห้อ HEIDOLPH ,Germany
3.1.15 เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ	รุ่น Z383K ยี่ห้อ HERMLE, Germany
3.1.16 เครื่องให้ความร้อน (hotplate stirrer)	รุ่น VS-130SH, Korea
3.1.17 ตู้ดูดควัน (fume hood)	science technology, TH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ซ้อนสแตนเลส
- 3.2.2 กระดาษวัดความเป็นกรด-เบส
- 3.2.3 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
- 3.2.4 ซ้อนตักสาร
- 3.2.5 ปีกเกอร์
- 3.2.6 กระบอกตวง
- 3.2.7 ปีเปต
- 3.2.8 ลูกยาง
- 3.2.9 แท่งแก้ว
- 3.2.10 ขวดดูแรน
- 3.2.11 หลอดหยด
- 3.2.12 ขวดฉีดน้ำกลั่น
- 3.2.13 หลอดทดลอง
- 3.2.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.15 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
- 3.2.16 ท่างเขี่ยเชื้อ
- 3.2.17 Centrifuge tube
- 3.2.18 Micro centrifuge tube
- 3.2.19 มีดผ่าตัด
- 3.2.20 Forceps
- 3.2.21 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.2.22 สำลีและผ้าก๊อซ
- 3.2.23 Needle
- 3.2.24 ขวดรูปชมพู่
- 3.2.25 Auto pipette
- 3.2.26 Tips
- 3.2.27 ขวดปรับปริมาตร
- 3.2.28 กรวยแยก
- 3.2.29 ไม้พันสำลี
- 3.2.30 Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 3.2.31 Vernier calipers

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.32 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1
- 3.2.33 แผ่น thin later chromatography
- 3.2.34 TLC tank
- 3.2.35 Spray gun
- 3.2.36 ขวด vial

### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch research laboratories Pvt. Ltd, India)
- 3.3.2 Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$  : BHD Chemical Ltd, Poole, England) (มวลโมเลกุล = 101.1032 กรัมต่อโมล)
- 3.3.3 Sodium chloride ( $\text{NaCl}$  : MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) (มวลโมเลกุล = 58.4428 กรัมต่อโมล)
- 3.3.4 Casein (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St. Louis, MO 63103, USA)
- 3.3.5 Magnesium sulfate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : fluka chemical AG CH-9470, Buchs, Switzerland) (มวลโมเลกุล = 246.4746 กรัมต่อโมล)
- 3.3.6 Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$  : ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวลโมเลกุล = 100.0869 กรัมต่อโมล)
- 3.3.7 Ferrous heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 278.0146 กรัมต่อโมล)
- 3.3.8 วุ้น (agar : Bio agar)
- 3.3.9 Distilled water
- 3.3.10 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.3.11 Nystatin
- 3.3.12 แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
- 3.3.13 Phenol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (มวลโมเลกุล = 94.1112 กรัมต่อโมล)
- 3.3.14 แป้งถั่วเหลือง (soya flour : doi kham food product Co., Ltd, TH)
- 3.3.15 Mannitol (มวลโมเลกุล = 182.1718 กรัมต่อโมล)
- 3.3.16 Peptone (titan biotech Ltd., India)
- 3.3.17 สารสกัดจากเนื้อ (biomark laboratories., India)
- 3.3.18 สารสกัดจากยีสต์ (biomark laboratories., India)
- 3.3.19 Glycerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  : ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวลโมเลกุล = 92.0938 กรัมต่อโมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.3.20 สารละลายเมทิลีนบลู

3.3.21 Skim milk powder (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.22 Casein enzymatic hydrolysate (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, SwastikDishaBussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.23 Glucose ( $C_6H_{12}O_6$  มวลโมเลกุล = 92.0938 กรัมต่อโมล)

3.3.24 Malt extract (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

3.3.25 Gelatin

3.3.26 Dipotassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$  : Carlo erba Ltd., Itary) (มวลโมเลกุล = 174.1759 กรัมต่อโมล)

3.3.27 Ammonium sulfate ( $(NH_4)_2SO_4$  : Carlo erba Ltd., Itary) (มวลโมเลกุล = 132.1395 กรัมต่อโมล)

3.3.28 Manganese (II) choride tetrahydrate ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  : ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวลโมเลกุล = 521.3915 กรัมต่อโมล)

3.3.29 Zinc sulfate hepahydrate ( $ZnSo_4 \cdot 7H_2O$  : fluka chemical AG CH-9470, Buchs, Switzerland) (มวลโมเลกุล = 287.5496 กรัมต่อโมล)

3.3.30 Sulfalinic acid

3.3.31 สารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine

3.3.32 สารละลายแกรมไอโอดีน

3.3.33 Ethyl acetate ( $C_4H_8O_2$  :Burdick & Jackson, SK Chemical, Korea) (มวลโมเลกุล = 88.1051 กรัมต่อโมล)

3.3.34 สารละลายมาตรฐาน Mcfarland NO.5

3.3.35 Chloroform ( $CHCl_3$  :BHD Chemicals Ltd, Poole, England) (มวลโมเลกุล = 119.38 กรัมต่อโมล)

3.3.36 สารละลาย เมทานอล (มวลโมเลกุล = 32.0419 กรัมต่อโมล)

3.3.37 สารละลายกรดอะซีติก (มวลโมเลกุล = 60.0520 กรัมต่อโมล)

3.3.38 สารละลายเอทานอล (Carlo erba Ltd., Itary) (มวลโมเลกุล = 46.0684 กรัมต่อโมล)

3.3.39 Ammonia monlybdrate tetrahydrate (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA) (มวลโมเลกุล = 1235.9975 กรัมต่อโมล)

3.3.40 Molybdenum trioxide (มวลโมเลกุล = 143.9582 กรัมต่อโมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.41 กรดซัลฟูริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 98.0785 กรัมต่อโมล)

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

3.4.1 Mueller-Hinton Broth (MHA :sisco research laboratories Pvt. Ltd., India)

3.4.2 Sabourand dextrose agar (SDA :Becton-Dickinson company sparks, MD 21152, USA)

### 3.5 ตัวอย่างดิน

3.5.1 ดินป่าชายเลนจังหวัดสมุทรปราการ (mangrove forest soils samutprakan province)

3.5.2 ดินป่าชายเลนจังหวัดฉะเชิงเทรา (mangrove forest soils chachoengsao province)

### 3.6 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Micrococcus luteus* TISTR 2374

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- *Staphyrococcus aureus* TISTR 118

3.6.2 เชื้อยีสต์ที่ใช้ทดสอบ

- *Candida albican* ATCC 90028

### 3.7 ฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน

3.7.1 L- $\alpha$ -phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

3.7.2 3-sn-phosphatidylethanolamine from bovine brain (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

3.7.3 Cardiolipin sodium salt from bovine heart (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.8 การเก็บตัวอย่างดิน การแยกเชื้อและการคัดแยกเชื้อ

#### 3.8.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เลือกจุดเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างจากในแผ่นดินออกสู่ทะเล กวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวน้ำดินออก จากนั้นทำการขุดดินลึกลงไป 2 - 3 เซนติเมตร โดยใช้ช้อนแกง หรือช้อนปลูกใส่ในถุงพลาสติกใสไม่รัดปากถุง ทำการวัดค่าความเป็นกรดเบสของดินด้วยกระดาษวัดพีเอชหรือ pH meter ให้ทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างประมาณ 500 กรัม โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บ ถ่ายภาพ และค่าความเป็นกรดเบสที่วัดได้

#### 3.8.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินจากข้อ 3.8.1 มาแยกเชื้อโดยการชั่งดินมา 1 กรัม จากตัวอย่างดินที่ตากแห้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อหรือภาชนะที่สะอาด แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่  $10^{-1}$  นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) นาน 6 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง  $10^{-5}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร ISP2 ซึ่งเติม Nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (ตรวจดูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์)

#### 3.8.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

##### 3.8.3.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินของความเจือจางที่  $10^{-1}$  ที่เหลืออยู่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ

##### 3.8.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1 - 2 กรัม ใส่ในถ้วยเซรามิคหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

### 3.8.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยช้อนตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที - 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส

### 3.8.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.8.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร ISP2 ที่เติม Nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร หรือ cross streak บนอาหารสูตร Soya Bean Flour - Mannitol agar (SFM agar) ที่เติม Nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้ว ทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารแข็ง ISP2 หรือ Hickey Tresner agar ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต

หมายเหตุ อาหารที่จะให้ได้สีส้มของโคโลนีที่สวยงามสำหรับการถ่ายรูปใช้อาหาร Starch - Casein agar หรือ Humic acid-salts-vitamin agar

### 3.8.5 การเตรียม spore suspension (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลตบนอาหาร ISP2 หรือ SFM agar จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุดแอสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 - 10 นาที เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด แล้วจึงทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

### 3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

#### 3.9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญของเชื้อโดยทำการแยกเชื้อด้วยเทคนิค cross streak ลงบนอาหาร starch - casein agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน และตรวจผลโดยการดูการเจริญ สีของเส้นใยเหนือผิวอาหาร สีของเส้นใยใต้ผิวอาหาร และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (Mundie, 1995) ตรวจดูลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

#### 3.9.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ

##### 3.9.2.1 การตกตะกอน และการย่อยสลายโปรตีน ในน้ำนม

ทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตในน้ำนม (skim milk ร้อยละ 10) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้นน้ำนมซึ่งมีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใส และเกิดการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนม

##### 3.9.2.2 การย่อยสลายเจลาติน

ทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อถ้ามีการมีการย่อยสลายเจลาตินก็จะไม่เกิดการแข็งตัวของอาหาร

##### 3.9.2.3 การย่อยสลายไนเตรท

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตใน Peptone KNO<sub>3</sub> broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน ตรวจผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิกลงไป 2 หยดและสารละลาย N,N-Dimethyl-1-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรต์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูถึงแดง

##### 3.9.2.4 การย่อยสลายแป้ง

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตโดยขีดลงบนอาหาร Inorganic salt-starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 - 14 วัน ตรวจผลโดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลงบนอาหารที่มีการเพาะเชื้อไว้ถ้ามีการย่อยสลายแป้งจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลนินของเชื้อแต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน

จากการศึกษาในข้อ 3.9 สามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆและนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

### 3.10 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น (Arasu *et al.*, 2013)

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเตี้ยยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสาร และแพร่เข้าสู่เนื้อวุ้น จากนั้นทำการทดสอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยลากเชื้อทดสอบให้เป็นเส้นตรงและตั้งฉากกับแนวของเชื้อ แอคติโนมัยซีทมากที่สุด แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจะถึงระยะที่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ จากการศึกษาจะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

### 3.11 การทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion (Ballav *et al.*, 2014)

#### 3.11.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทเลี้ยงบนอาหาร Yeast extract – malt extract agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเขี่ยสปอร์ของเชื้อจำนวนหนึ่งโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายลงในอาหาร Yeast extract – malt extract broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าพีเอชที่ 7.2 บ่มไว้ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Yeast extract – malt extract broth ที่มีการเติม 0.3 %  $\text{CaCO}_3$  ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าพีเอชที่ 7.2 โดยทำการ inoculum ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ได้ทำการเลี้ยงไว้จนครบ 5 วัน บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

#### 3.11.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เรีย

นำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทจากข้อ 3.11.1 มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีท และอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำน้ำหมักส่วนใสที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทิลอะซิเตต โดยทำการเติมเอทิลอะซิเตตลงไปในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในเฟสบนของเอทิลอะซิเตตที่มีสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากเฟสของน้ำ จากนั้นนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันที่ต่ำกว่าความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำเอทิลอะซิเตตที่ระเหยไปทิ้งในตู้ดูดอากาศจนหมด ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำหมักเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ได้ มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 3.11.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และการเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

#### 3.11.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน แมคฟาแลน หมายเลข 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml

#### 3.11.3.2 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมอาหาร Mueller's hinton agar หรือ Tryptic soy agar สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Sabourand's agar (SDA) เป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงทดสอบเชื้อยีสต์ โดยทำการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

### 3.11.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสารซึ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้ง จะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (sterile swab) ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.11.3.1 แล้วทา (swab) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากข้อ 3.11.2 ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบรองนึ่ง จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทาเชื้อเอาไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยวิธีการวัดขนาดของเส้น

เอกสารผ่านศูนย์กลางบริเวณใต้เชื้อไม่เจริญในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร มอนูญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.12 การศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอสคิโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Klanbut, 2013)

#### 3.12.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีท

ทำการเพาะเชื้อแอสคิโนมัยซีทด้วยหัวเชื้อลงในอาหารเหลว Yeast extract – malt extract broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ค่าพีเอชที่ 7.2 บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วทำการเลี้ยงต่อในอาหาร Yeast extract – malt extract broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าพีเอชที่ 7.2 โดยทำการเติม inoculum ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เลี้ยงไว้จนครบ 8 ชั่วโมง ใส่ลงไป บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.12.2 การศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอสคิโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของเชื้อที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนของเชื้อที่ได้ เทสารละลายส่วนใสทิ้งไป ตักตะกอนของเชื้อปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ micro centrifuge tube เดิมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร vortex 2 นาที เมทานอล 200 ไมโครลิตร vortex 2 นาที และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 ไมโครลิตร vortex 2 นาที จากนั้นทำการเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเพิ่มลงไปในตัวอย่าง แล้วทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที เมื่อสารตัวอย่างเข้ากันแล้วจึงทำการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 100 ไมโครลิตร และทำการ vortex เพื่อผสมสารให้เข้ากันอีกเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการแยกเฟส โดยใช้ข้อโต้เปิดดูดเอาชั้นอินออร์แกนิกเฟส ที่อยู่ข้างล่างสุด ถ้าย้ายใส่ micro centrifuge tube หลอดใหม่ นำส่วนที่เหลือนำมาทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ข้อโต้เปิดขนาดเล็กดูดนำสารตัวอย่างที่ใสมาจุดทีละ 1 ไมโครลิตร จนสารหมด ลงบนแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะที่มีฝาปิด ซึ่งมี คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80/12/15/4 ปริมาตร/ปริมาตรตามลำดับ และมีแผ่นกระดาษกรอง whatman บูทิง 4 ด้านของ tank โดยกระดาษกรองชุ่มด้วยสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ปล่ยทิ้งไว้ให้สารตัวพาวัง ปล่ยให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นมาจน ประมาณ  $\frac{3}{4}$  ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออก ทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน และทำเครื่องหมายตามแนวของตัวทำละลาย เมื่อแผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 - 3 นาที จะเห็นจุดสีน้ำเงินบริเวณที่มีสารตัวอย่างอยู่ จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆ บนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า  $R_f$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสโฟลิปิดมาตรฐานที่ละลายในเอทานอล ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ L- $\alpha$ -phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG) หยดลงไป 10 ไมโครลิตร, 3-sn-phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) หยดลงไป 20 ไมโครลิตร และ cardiolipin sodium salt from bovine heart (CL) หยดลงไป 20 ไมโครลิตร ได้ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ เพื่อช่วยในการจำแนกเอกลักษณ์ของ unknown spot



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปราย

#### 4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากการเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692) และจากป่าชายเลนอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449) เพื่อนำมาทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท (วิธีการทดลองที่ 3.8.2) พบว่าจากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมดจำนวน 31 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงความสูงจากระดับน้ำทะเล

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (m)
1	8.0
2	7.9
3	7.8
4	7.0
5	7.0
6	7.0
7	6.9
8	6.7
9	4.8
10	4.6
11	4.3
12	3.9
13	2.0
14	2.6
15	2.5
16	2.1
17	3.4
18	3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงความสูงจากระดับน้ำทะเล (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (m)
19	3.5
20	1.7
21	1.4
22	1.6
23	1.7
24	2.5
25	2.8
26	2.7
27	2.6
28	2.2
29	4.0
30	4.0

หมายเหตุ

- ดิน 1 - 12 จากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)
- ดิน 13 - 30 จากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	รหัสตัวอย่างดิน	หมายเลขไอโซเลต
1	PMP1	-
2	PMP2	-
3	PMP3	-
4	PMP4	-
5	PMP5	-
6	PMP6	-
7	PMP7	-
8	PMP8	-
9	PMP9	PMP9-10, PMP9-11
10	PMP10	PMP10-12, PMP10-13, PMP10-14
11	PMP11	PMP11-21
12	PMP12	PMP12-24
13	PMP13	-
14	PMP14	-
15	PMP15	-
16	PMP16	-
17	PMP17	-
18	PMP18	PMP18-26, PMP18-27, PMP18-28
19	PMP19	PMP19-29, PMP19-30
20	PMP20	PMP20-31, PMP20-32
21	PMP21	PMP21-33, PMP21-34, PMP21-35
22	PMP22	PMP22-36, PMP22-37, PMP22-38, PMP22-39
23	PMP23	PMP23-40, PMP23-42
24	PMP24	PMP24-43
25	PMP25	PMP25-46, PMP25-47
26	PMP26	PMP26-50
27	PMP27	PMP27-54, PMP27-55, PMP27-56
28	PMP28	PMP28-58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	รหัสตัวอย่างดิน	หมายเลขไอโซเลต
29	PMP29	-
30	PMP30	-

หมายเหตุ

- จุดเก็บตัวอย่างดิน 1 - 12 จากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)

- จุดเก็บตัวอย่างดินดิน 13 - 30 จากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)

จากการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้เพียง 31 ไอโซเลตเท่านั้น Ballav และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเล โดยทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนด้วยน้ำทะเลเทียม ซึ่งเหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเนื่องจากมีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อม ณ บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง จึงทำให้สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้มาก ซึ่งต่างจากงานวิจัยของคณะผู้จัดทำ ที่ทำการเจือจางตัวอย่างดินด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อซึ่งมีคุณสมบัติต่างจากสภาพแวดล้อมของดินบริเวณป่าชายเลน จึงอาจส่งผลให้คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ไม่มากเท่าที่ควร นอกจากนี้ในขั้นตอนการคัดแยกเชื้อมีการใส่ nystatin ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของราจึงทำให้เราไม่สามารถเจริญได้ง่ายต่อการคัดเลือก แต่เนื่องจากในดินยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นนอกจากแอกติโนมัยซีทอาศัยอยู่อีกมากมาย เพื่อการคัดแยกที่ดีขึ้นควรทำการเติมสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ จึงอาจทำให้การคัดแยกมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## 4.2 ผลการหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

### 4.2.1 การหาน้ำหนักดิน

นำตัวอย่างดินที่มีความเจือจางที่  $10^{-1}$  จากจุดเก็บตัวอย่างดินทั้ง 30 จุด ใส่ลงในภาชนะที่ทราบน้ำหนัก แล้วจึงนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและดินมีน้ำหนักที่คงที่ (วิธีการทดลองที่ 3.8.3.1) จากนั้นจึงทำการคำนวณหาน้ำหนักของดินหลังอบที่ใช้ในการตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (วิธีการคำนวณ ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่มีความเจือจาง  $10^{-1}$  หลังอบ

จุดเก็บ ตัวอย่าง ดิน	น้ำหนัก ภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักภาชนะ กับน้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักภาชนะ กับน้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ หลังอบ (กรัม)
1	46.413	7.638	54.051	47.178	0.765
2	40.748	7.594	48.342	41.373	0.589
3	44.387	8.101	52.488	45.264	0.877
4	48.321	8.059	56.321	49.209	0.888
5	44.218	8.796	53.014	45.315	1.097
6	45.834	8.008	53.842	46.376	0.542
7	47.639	7.692	55.331	48.234	0.595
8	42.532	8.217	50.749	43.138	0.606
9	48.264	8.436	56.373	49.133	0.869
10	51.373	7.533	58.906	52.012	0.639
11	48.849	8.346	57.195	49.670	0.821
12	43.577	8.228	51.805	44.503	0.926
13	42.134	8.850	50.984	43.312	1.178
14	47.635	7.202	54.837	48.135	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณของน้ำหนักรากแขวนลอยของดินที่ความเง็องจาง  $10^{-1}$  หลังอบ (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักรากแขวนลอยของดินที่ความเง็องจาง $10^{-1}$ ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักรากแขวนลอยของดินที่ความเง็องจาง $10^{-1}$ ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักรากแขวนลอยของดินที่ความเง็องจาง $10^{-1}$ หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักรากแขวนลอยของดินที่ความเง็องจาง $10^{-1}$ หลังอบ (กรัม)
15	50.498	7.133	57.631	50.934	0.436
16	48.341	7.600	55.941	49.298	0.957
17	45.784	7.453	53.237	46.287	0.503
18	46.356	7.636	53.992	47.016	0.66
19	51.370	8.053	59.423	52.325	0.985
20	47.834	7.128	54.962	48.031	0.197
21	41.771	7.103	48.874	42.048	0.277
22	44.382	8.513	52.895	45.782	1.4
23	49.894	8.232	58.126	50.841	0.947
24	45.834	7.730	53.564	46.365	0.531
25	40.547	8.440	48.987	41.766	1.219
26	42.371	7.945	50.316	43.249	0.878
27	47.339	8.532	55.871	48.735	1.396
28	50.374	7.754	58.128	51.043	0.669
29	46.514	8.167	54.681	47.523	1.009
30	48.384	7.730	56.114	49.145	0.761

หมายเหตุ

- ดิน 1 - 12 จากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)

- ดิน 13 - 30 จากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)

#### 4.2.2 การหาปริมาณความชื้น

ทำการชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัม ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก แล้วจึงนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักของดินมีความคงที่ (วิธีการทดลองที่ 3.8.3.2) จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินจากน้ำหนักดินที่หายไป (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักของดินคงที่

จุดเก็บ ตัวอย่าง ดิน	น้ำหนัก ปิ๊กเกอร์ (กรัม)	น้ำหนักดิน ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน และปิ๊กเกอร์ หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักของ ของน้ำ (กรัม)	ปริมาณ ความชื้น (%)
1	30.127	1.782	31.439	1.312	0.470	26.36
2	30.245	1.801	31.512	1.267	0.534	29.65
3	29.985	1.749	30.965	0.980	0.769	43.97
4	28.869	1.737	29.742	0.873	0.864	49.74
5	31.253	2.063	32.541	1.288	0.775	37.57
6	32.496	1.943	33.154	0.658	1.285	66.135
7	28.870	1.816	29.802	0.932	0.884	48.68
8	30.114	1.910	30.732	0.618	1.292	67.64
9	27.431	1.927	28.345	0.914	1.013	52.57
10	30.061	2.090	31.491	1.430	0.660	31.58
11	32.690	1.776	33.590	0.900	0.876	49.32
12	30.148	1.824	31.273	1.125	0.699	38.32
13	31.877	1.929	30.451	0.564	1.365	70.76
14	31.439	1.941	32.756	1.371	0.624	32.15
15	30.003	1.919	31.015	1.012	0.907	47.26
16	29.891	2.143	30.659	0.768	1.375	64.16
17	28.721	2.028	29.612	0.891	1.137	56.07
18	28.927	1.922	30.007	1.080	0.842	43.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักของดินคงที่ (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักปีกเกอร์ (กรัม)	น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดินและปีกเกอร์หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ปริมาณความชื้น (%)
19	31.367	2.119	32.156	0.789	1.330	62.77
20	30.283	1.728	30.995	0.712	1.016	58.80
21	29.968	1.925	31.012	1.044	0.881	45.77
22	27.224	1.775	28.437	1.213	0.562	31.66
23	32.168	1.881	33.104	0.936	0.945	50.24
24	29.290	1.920	29.980	0.690	1.230	64.06
25	28.493	2.111	29.349	0.856	1.255	59.45
26	28.473	1.761	29.643	1.170	0.591	33.54
27	30.547	1.749	31.783	1.236	0.558	37.10
28	30.782	2.015	32.014	1.232	0.783	38.86
29	31.525	1.954	32.675	1.150	0.804	41.15
30	28.352	1.823	29.150	0.798	1.025	56.23

หมายเหตุ

- ดิน 1 - 12 จากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)

- ดิน 13 - 30 จากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.3 การวัดค่าความเป็นกรด-เบส

ทำการชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยโดยทำการคนตัวอย่างไปด้วย จนสังเกตเห็นเป็นแผ่นฟิล์มบางๆที่บริเวณผิวหน้า (วิธีการทดลอง 3.8.3.3) จากนั้นจึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบสด้วยเครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) โดยจะทำการวัดค่าความเป็นกรดเบส ณ จุดเก็บตัวอย่างดิน และ ณ ห้องปฏิบัติการ ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ณ จุดเก็บตัวอย่าง	ณ ห้องปฏิบัติการ
1	6.63	6.90
2	5.73	5.74
3	5.52	5.55
4	5.53	5.30
5	6.45	6.45
6	6.53	6.54
7	6.17	6.23
8	5.50	5.62
9	6.89	6.71
10	6.90	7.05
11	7.21	7.10
12	7.20	7.37
13	6.91	6.83
14	6.88	7.01
15	7.00	7.13
16	7.25	7.11
17	6.31	6.50
18	6.99	7.08
19	6.88	7.01
20	6.49	6.29
21	6.36	6.30
22	6.43	6.23
23	6.69	6.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ณ จุดเก็บตัวอย่าง	ณ ห้องปฏิบัติการ
24	6.88	6.77
25	7.01	6.98
26	7.35	7.10
27	7.03	7.00
28	6.93	6.71
29	6.95	6.84
30	6.83	7.06

หมายเหตุ

- ดิน 1 - 12 จากป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)
- ดิน 13 - 30 จากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)

จากผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินจุดต่างๆ พบว่าค่าความเป็นกรดต่างของดินบางจุดเก็บตัวอย่างมีความเป็นกรดมากกว่าปกติโดยเกิดจากการที่ช่วงระยะเวลาที่ออกเก็บตัวอย่างตรงกับช่วงหน้ามรสุมทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดินมีค่าต่ำกว่า 7 ซึ่งขัดกับความเป็นจริงเพราะโดยปกติแล้วดินที่เก็บจากป่าชายเลนซึ่งมีระบบนิเวศน์เป็นน้ำกร่อยมักมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-8 (นริศ และคณะ, 2557)

### 4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินมัยซีท

#### 4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยซีท

เชื้อแอสคิตินมัยซีทที่ถูกทำการแยกให้เป็นโคลนเดี่ยวด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร Starch – Casein agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ดังวิธีการทดลอง 3.9.1) มีจำนวนทั้งหมด 31 ไอโซเลต (แสดงในตารางที่ 4.6) ได้ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะการเจริญ เทียบสีของเส้นใยที่ผิวหน้าอาหาร ได้ผิวอาหาร และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ด้วยกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (Mundie, 1995) (ภาคผนวก ค) และทำการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและสปอร์ด้วยเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (ภาคผนวก ง) แสดงในตารางที่ 4.6



ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
1	PMP9-10	ดี	Dark Reddish Brown #321011	Strong Reddish Brown #7F180D	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Ovoid	สายสั้น
2	PMP9-11	น้อย	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
	PMP11-21	น้อย	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
	PMP18-26	ปานกลาง	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
	PMP20-32	ปานกลาง	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
3	PMP10-12	ปานกลาง	Light Greenish Gray #BAAF96	Vivid Yellow #FFB300	Brilliant Greenish Yellow #FFDC33	Ovoid	สายสั้น
	PMP20-31	ปานกลาง	Light Greenish Gray #BAAF96	Vivid Yellow #FFB300	Brilliant Greenish Yellow #FFDC33	Globose	Flexons

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
3	PMP21-35	ปานกลาง	Light Greenish Gray #BAAF96	Vivid Yellow #FFB300	Brilliant Greenish Yellow #FFDC33	Ovoid	สายสั้น
4	PMP10-13	ดี	Pinkish Gray #C8A696	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
	PMP10-14	ปานกลาง	Pinkish Gray #C8A696	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Globose	Verticillati
	PMP19-30	ปานกลาง	Pinkish Gray #C8A696	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Globose	สายยาว
5	PMP12-24	ดี	Very pale Purplish Blue #CBBAC5	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
6	PMP19-29	ดี	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Globose	สายสั้น
	PMP21-33	ปานกลาง	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Rod-shape	สายสั้น

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลท	การเจริญบน อาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลาย น้ำ	ลักษณะสปอร์	การจัดเรียงตัวของ สปอร์
6	PMP22-37	ดี	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	Rod-shape	สายสั้น
	PMP22-38	ปานกลาง	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้าง สปอร์	ไม่มีการสร้าง สปอร์
	PMP23-40	ดี	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	Doliform	สายยาว
	PMP25-46	ดี	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้าง สปอร์	ไม่มีการสร้าง สปอร์
	PMP27-56	ดี	Very Pale Blue #BCD4E6	Moderate Brown #673923	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	Ovoid	สายสั้น
7	PMP21-34	ดี	White #F2F3F4	Dark Olive Brown #302112	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	Globose	สายสั้น
8	PMP18-27	น้อย	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำได้	Ovoid	สายยาว

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
8	PMP18-28	น้อย	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Ovoid	สายยาว
	PMP22-36	ดี	White #F2F3F4	Pale Yellow Green #F0D698	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Globose	สายสั้น
9	PMP22-39	น้อย	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Light Greenish Yellow #FFDE5A	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
	PMP24-43	น้อย	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Globose	สายสั้น
	PMP27-55	น้อย	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Doliform	สายยาว
	PMP28-58	น้อย	White #F2F3F4	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Light Greenish Yellow #FFDE5A	Doliform	สายสั้น
10	PMP23-42	น้อย	Moderate Orange #E8793E	Deep Orange Yellow #C98500	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัม (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร SCA	สีของ aerial mycelium	สีของ substrate mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
10	PMP27-54	น้อย	Moderate Orange #E8793E	Deep Orange Yellow #C98500	Light Orange #FFA161	Ovoid	Retinaculiaperti
11	PMP25-47	น้อย	Moderate Pink #EE9086	Greenish White #F5E6CB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ไม่มีการสร้างสปอร์	ไม่มีการสร้างสปอร์
12	PMP26-50	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Deep Yellow #B57900	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้	Globose	สายยาว

หมายเหตุ

SCA = Starch – Casein agar

#xxxxxx = แสดงสัญลักษณ์ของระบบสี RGB (red, green และ blue) ซึ่งเป็นระบบสีที่เกิดจากการรวมกันของแสงสีแดง เขียว และน้ำเงิน เช่น #EE9086 แสดงสี Moderate Pink เป็นต้น

จากการเทียบสี aerial mycelium และ substrate mycelium ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมโดยใช้อาหาร Starch casein agar (SCA) ยังสามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่เป็นอาหารเฉพาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมได้อีกด้วยประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่ม International Streptomyces Project (ISP) ยกตัวอย่างเช่น Yeast extract – malt extract agar (ISP2) และ Inorganic salt-starch agar (ISP4) เป็นต้น

#### 4.3.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

ในการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ณ ป่าชายเลน ตำบลบางปู อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ และอำเภอบางพระ จังหวัดฉะเชิงเทรา ( ดังวิธีการทดลองที่ 3.9.2) มีการศึกษาทั้งหมด 5 การทดสอบ คือ

1. การทดสอบ การตกตะกอน ในหลอดอาหาร Skim milk 10% ถ้าหากเกิดการตกตะกอนของโปรตีนจะเกิดตะกอนในน้ำนมที่บริเวณก้นหลอด โดยเทียบกับชุดควบคุม (Control)
2. การย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar ถ้าเกิดการย่อยสลายโปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นสีใส
3. การย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth ถ้าเกิดการย่อยสลายของเจลาติน จะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ( Control )
4. การย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth ทำการตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟาลีนิก และสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine ถ้าเชื้อแอสคิโนมัยซีทสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ได้ จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงที่บริเวณผิวหน้าของอาหารหลังจากหยดสารละลายทดสอบลงไป
5. การทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar ทำการตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลงบนอาหาร ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมี ดังที่กล่าวมาข้างต้นของเชื้อแอสคิโนมัยซีททั้ง 31 ไอโซเลต จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อที่ให้ผลการทดสอบเหมือนกันเป็น 12 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลต	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Coagulation	Peptonization			
1	PMP9-10	+	-	-	-	+
2	PMP9-11	-	-	-	-	+
	PMP11-21	W	-	-	-	+
	PMP18-26	-	-	-	-	+
	PMP20-32	W	-	+	-	+
3	PMP10-12	W	W	-	+	W
	PMP20-31	W	-	-	-	W
	PMP21-35	W	-	+	-	-
4	PMP10-13	W	+	+	-	+
	PMP10-14	+	-	-	+	+
	PMP19-30	W	W	-	-	W
5	PMP12-24	W	-	-	-	+
6	PMP19-29	W	-	-	+	-
	PMP21-33	W	-	+	-	+
	PMP22-37	W	-	+	+	W
	PMP22-38	W	-	+	+	-
	PMP23-40	W	-	-	+	W
	PMP25-46	-	+	+	-	+
7	PMP21-34	W	-	+	-	+
8	PMP18-27	W	-	-	+	+
	PMP18-28	W	-	-	-	+
	PMP22-36	+	-	-	-	+
9	PMP22-39	-	-	-	-	+
	PMP24-43	W	-	+	-	+
	PMP27-55	W	-	+	-	+
	PMP28-58	-	-	+	-	-
10	PMP23-42	-	-	+	-	-
	PMP27-54	W	-	+	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่าารตีพิมพ์ หรือ อื่นๆ หากมีให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลข ไอโซเลต	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Coagulation	Peptonization			
11	PMP25-47	-	-	+	+	-
12	PMP26-50	-	-	-	+	+

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

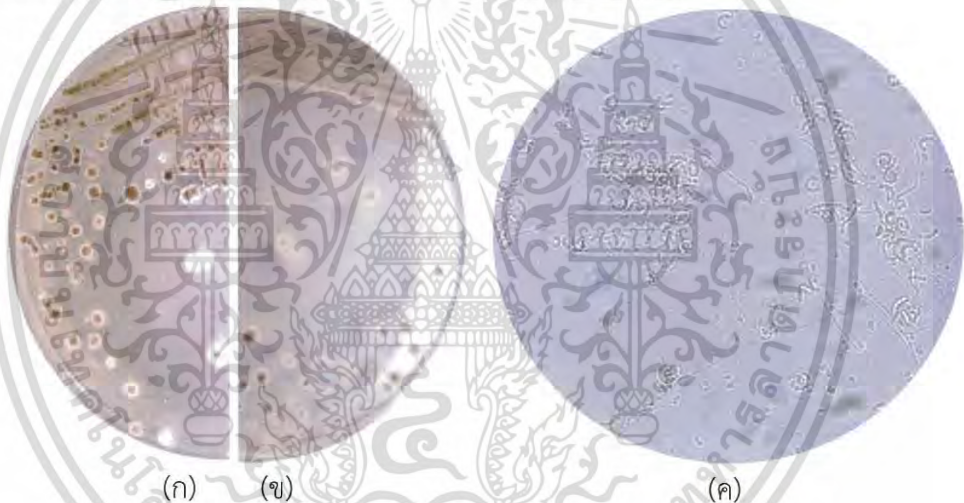


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตสีของ รังควัตถุ aerial และ substrate mycelium โดยเทียบกับกระดาศสีมาตรฐาน ( the NBs/IBCC color system) (Mundie,1995) สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ออกเป็น 12 กลุ่ม ดังนี้

**กลุ่มที่ 1** เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Dark Reddish Brown เส้นใยอาหารสี Strong Reddish Brown ไม่สร้างรังควัตถุที่ละลายน้ำได้ แต่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.1, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย

1.1 PMP9-10 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escehrichia coli* ATCC 25922, *Stapphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

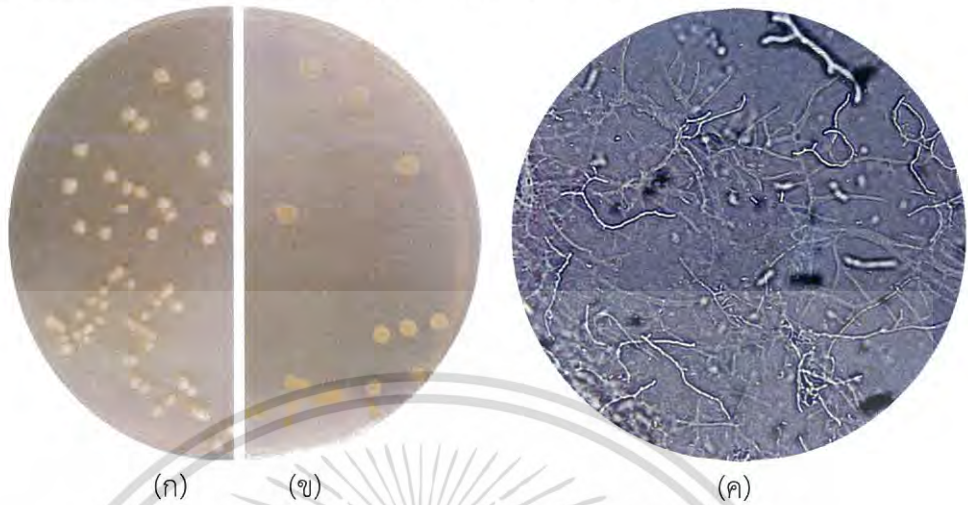
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 2** เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรังควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.2-4.5, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย

2.1 PMP9-11 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถย่อยสลายเอ็กสาร์ไนโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อยเจลาติน แต่สามารถย่อยแป้งไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

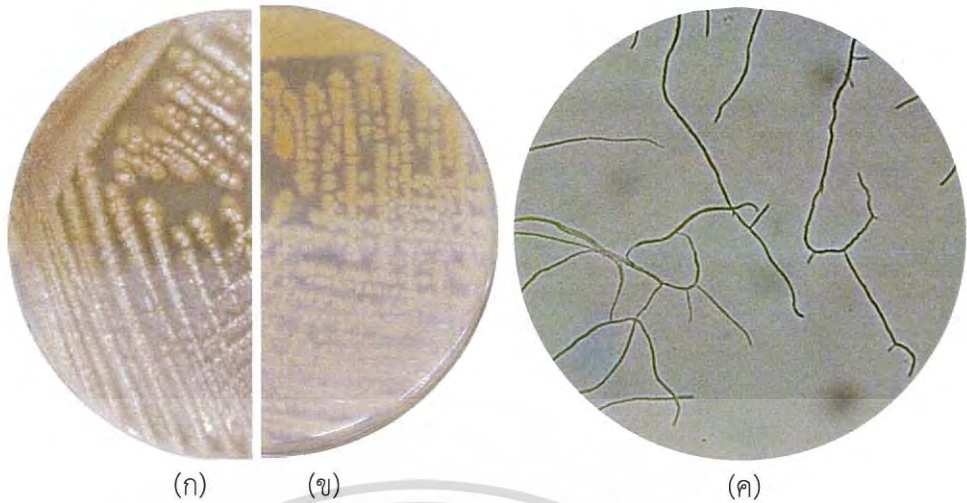
ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-11

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-11 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-11 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-11 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.2 PMP11-21 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้ง แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



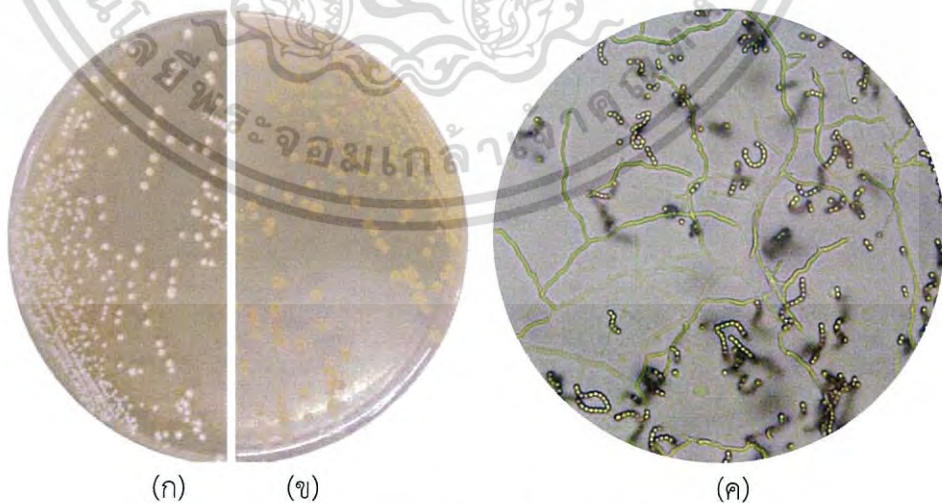
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.3 PMP18-26 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อยเจลาติน แต่สามารถย่อยแป้งได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)

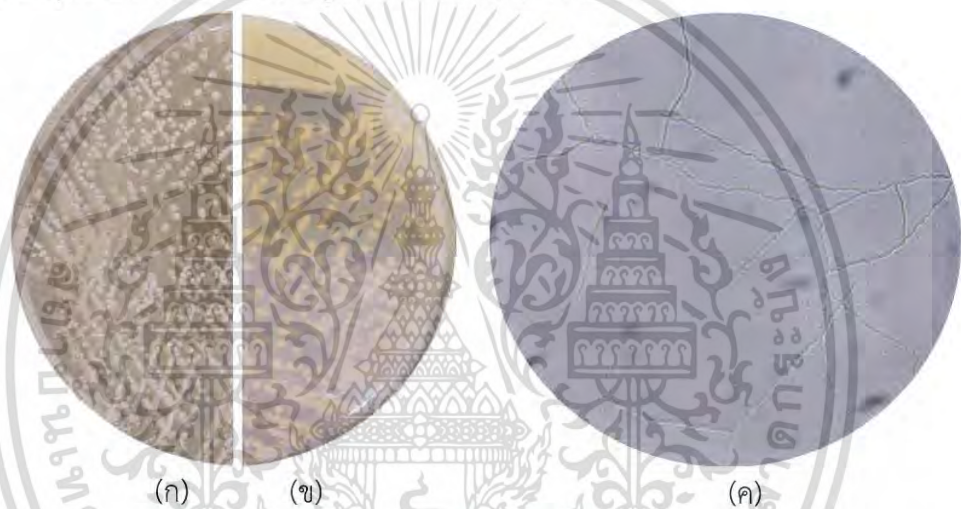


รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-26 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-26 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-26 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

2.4 PMP20-32 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาติน สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรที่ได้อัตราที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32

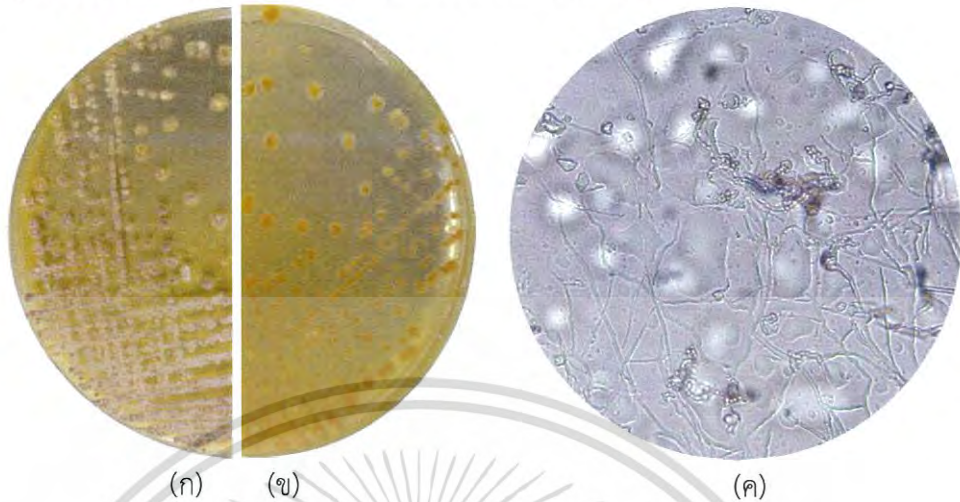
- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสทีโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสทีโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Light Greenish Gray เส้นใยอาหารสี Vivid Yellow มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Brilliant Greenish มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.6-4.8, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลตประกอบด้วย

3.1 PMP10-12 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และย่อยแป้งได้เล็กน้อย สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรที่ แต่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

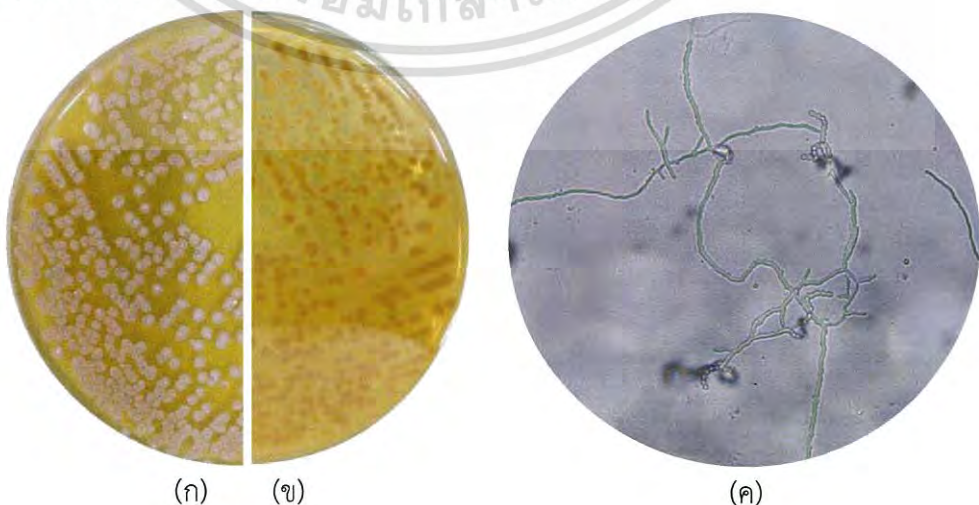
4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-12

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-12 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-12 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

3.2 PMP20-31 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม และสามารถย่อยแบ่งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้ (ตารางที่ 4.8)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนรูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-31 ชนิดการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-31 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-31 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-31 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

3.3 PMP21-35 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้ง แต่ไม่สามารถสามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

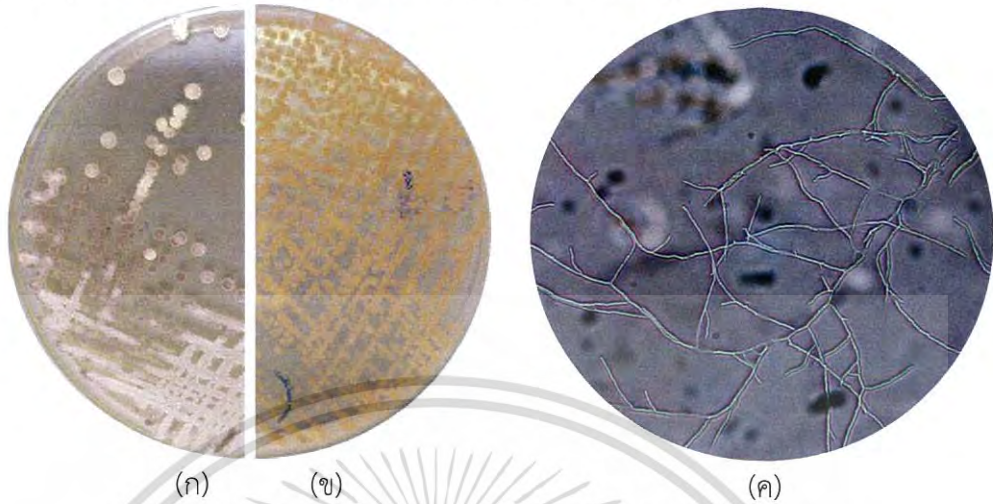
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pinkish Gray เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.9-4.11, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลตประกอบด้วย

4.1 PMP10-13 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแป้ง และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



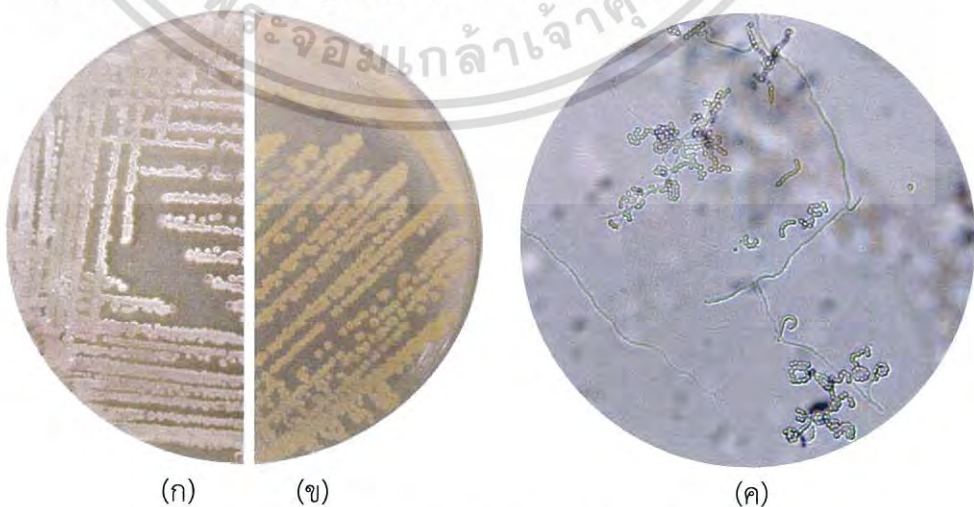
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP20-32

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-13 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-13 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-13 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.2 PMP10-14 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถย่อยแป้งได้ สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)

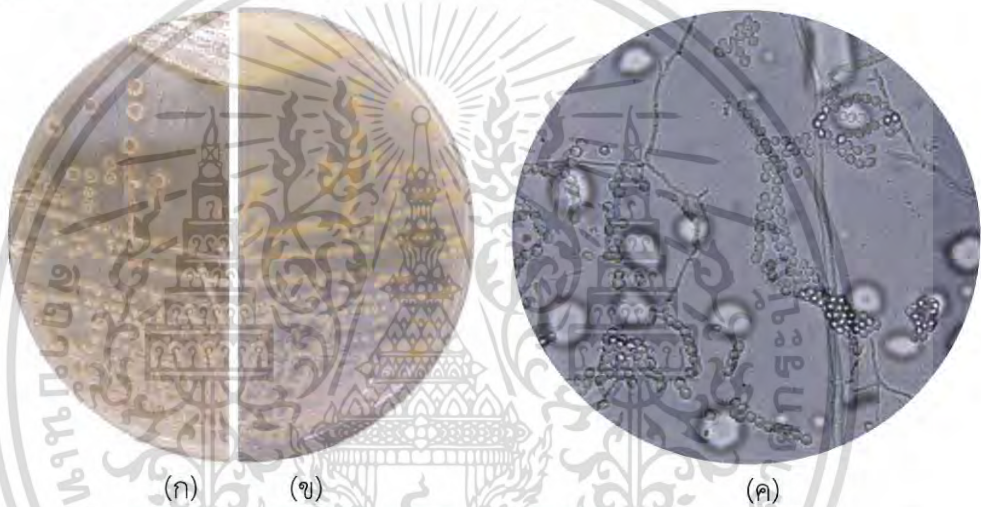


รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP10-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP10-14 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP10-14 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP10-14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

4.3 PMP19-30 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)

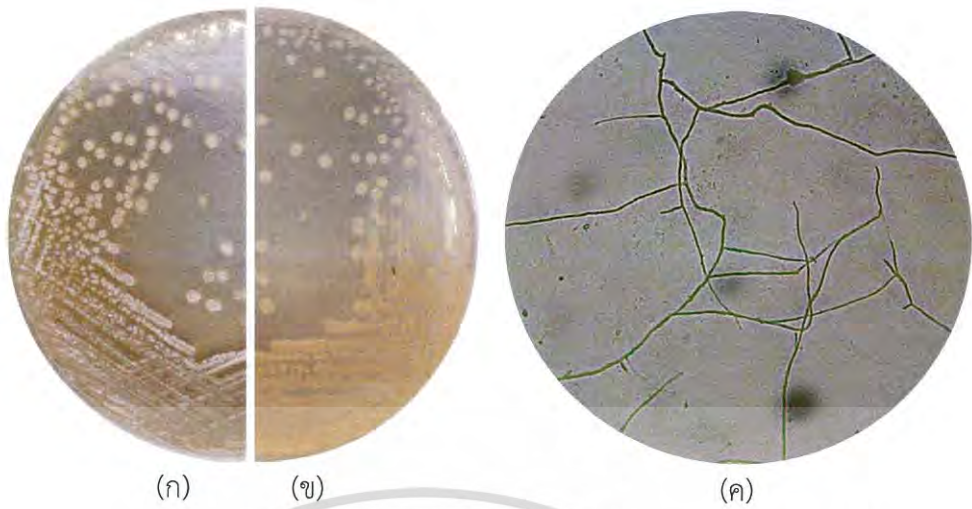


รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP19-30

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP19-30 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP19-30 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสคิตินอไมซีทไอโซเลต PMP19-30 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสคิตินอไมซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Very pale Purplish เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.12, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย

5.1 PMP12-24 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งได้ สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8) ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

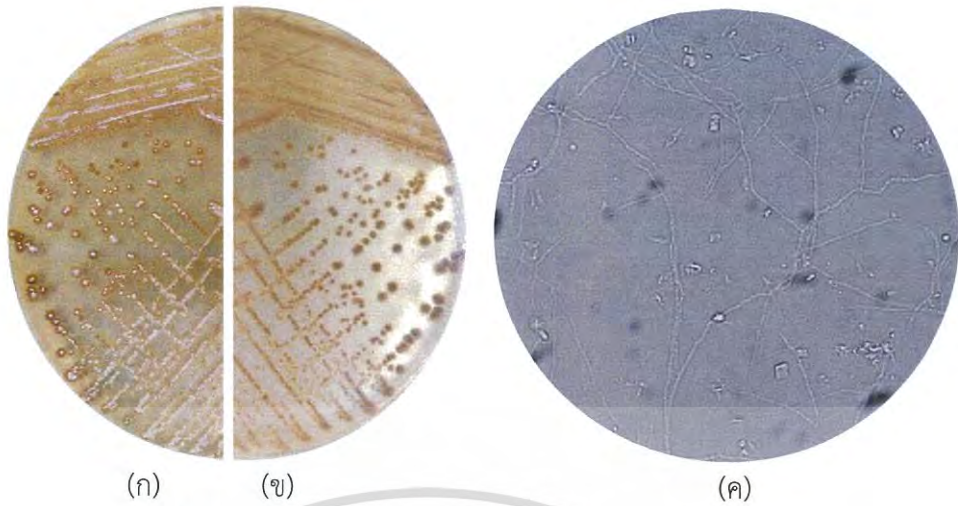


รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP12-24

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP12-24 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP12-24 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP12-24 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.13-4.19, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 7 ไอโซเลตประกอบด้วย

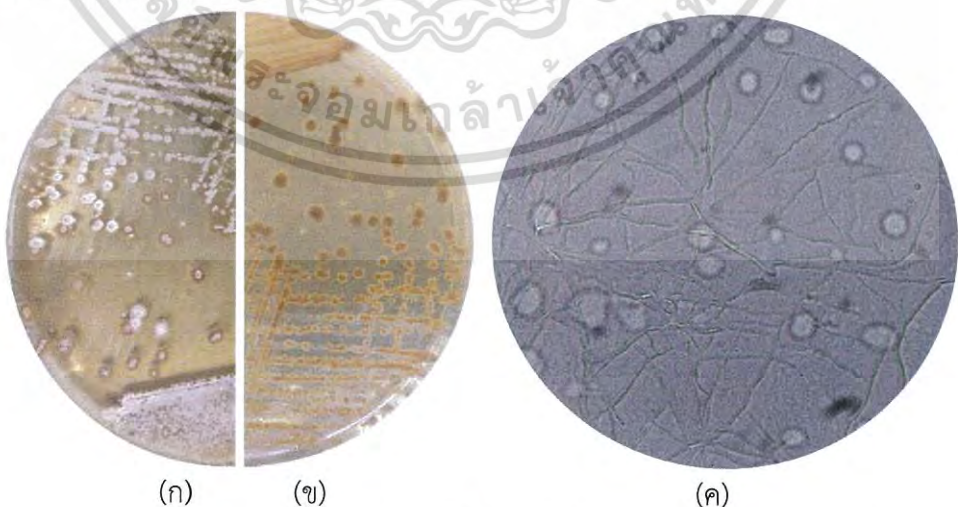
6.1 PMP19-29 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถย่อยแป้งได้ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารหุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-29

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-29 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-29 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP19-29 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

6.2 PMP21-33 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งได้ สามารถย่อยเจลาติน แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรที่ได (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Escehrichia coli* ATCC 25922 ได้ (ตาราง 4.8)

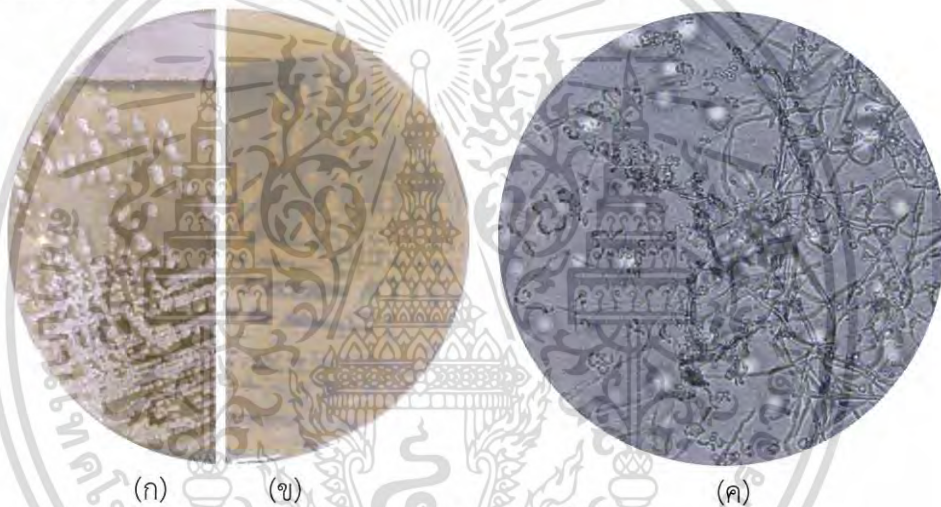


รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP21-33 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP21-33 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP21-33 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

6.3 PMP22-37 โดยไฮสเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม และย่อยแป้งได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาติน และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮสเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)

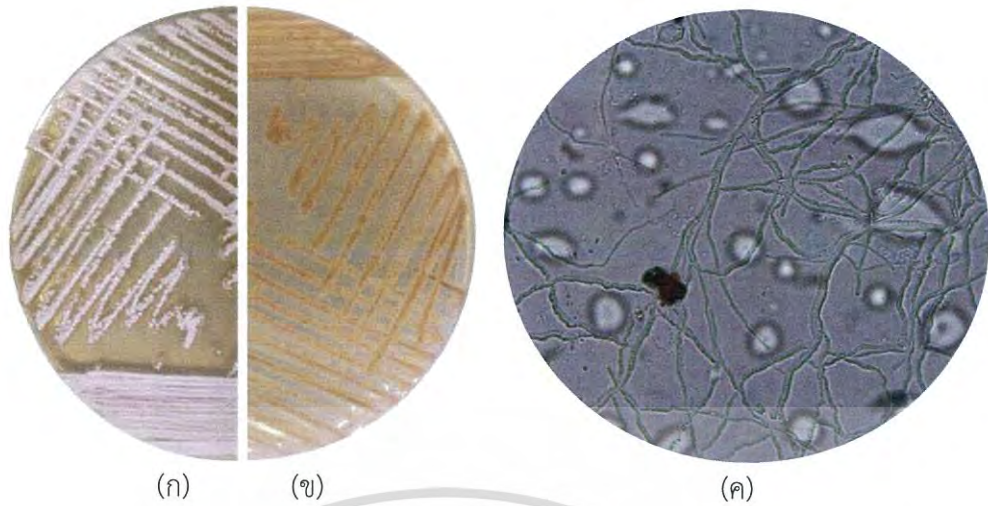


รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP22-37

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP22-37 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP22-37 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเลต PMP22-37 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

6.4 PMP22-38 โดยไฮสเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาติน และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถย่อยแป้ง (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮสเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



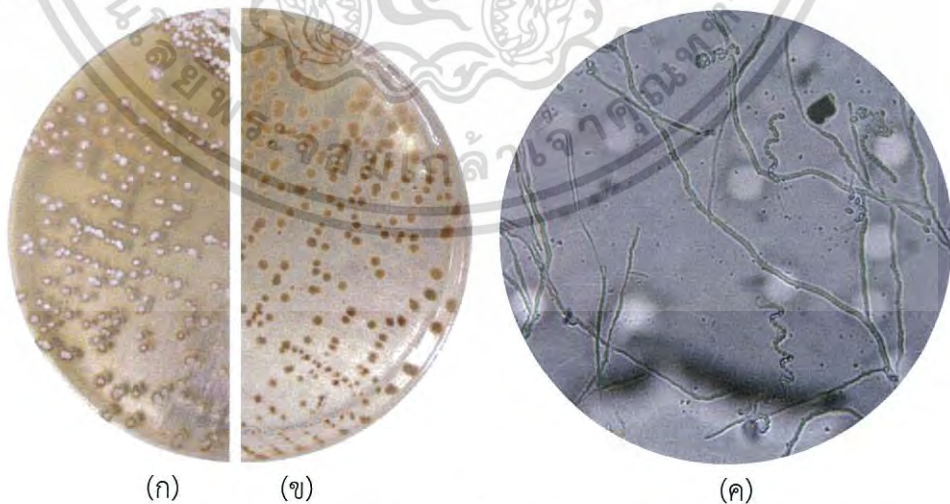
รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-38

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-38 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-38 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-38 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

6.5 PMP23-40 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม และย่อยแป้งได้เล็กน้อย สามารถเปลี่ยนเนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP23-40 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP23-40 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP23-40 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

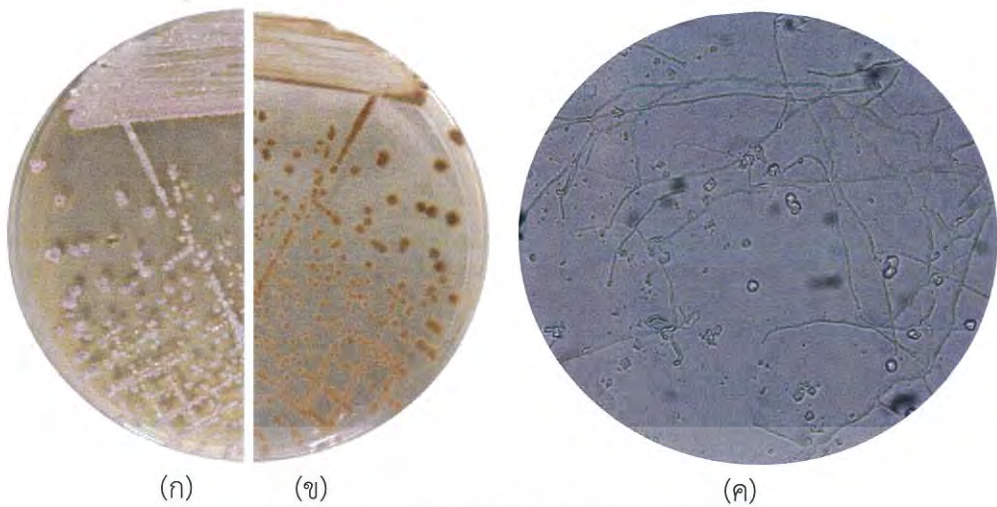
6.6 PMP25-46 โดยไฮสเตรตนี้สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยเจลาติน และสามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮสเตรตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP25-46

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP25-46 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP25-46 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสเตรต PMP25-46 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

6.7 PMP27-56 โดยไฮสเตรตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และสามารถย่อยเจลาติน แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮสเตรตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)

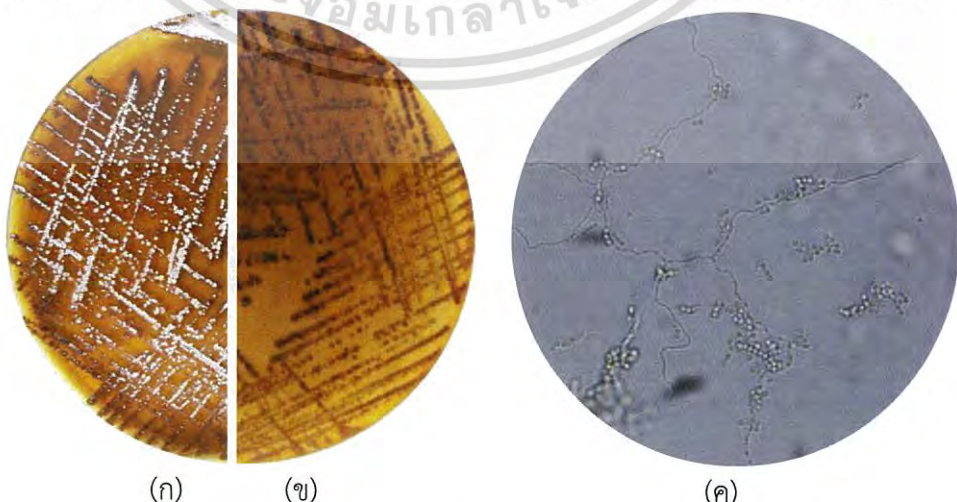


รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-56

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-56 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-56 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-56 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Dark Olive Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.20, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย

7.1 PMP21-34 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาติน สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการวิจัยเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่ขึ้นด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP21-34 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP21-34 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP21-34 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียมที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.21-4.23, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย

8.1 PMP18-27 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถย่อยเจลาติน (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP18-27

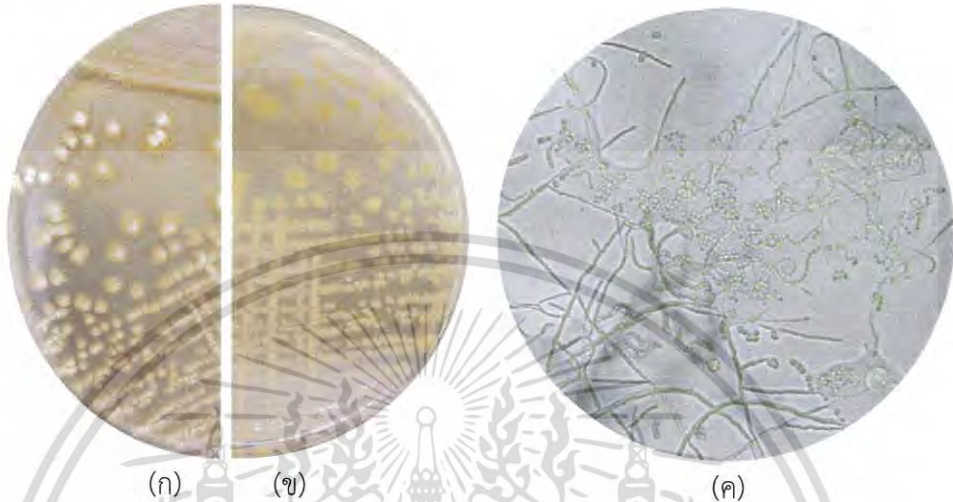
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP18-27 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP18-27 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP18-27 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

8.2 PMP18-28 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ และไม่เอกลำไส้เป็นเอกลำไส้ที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

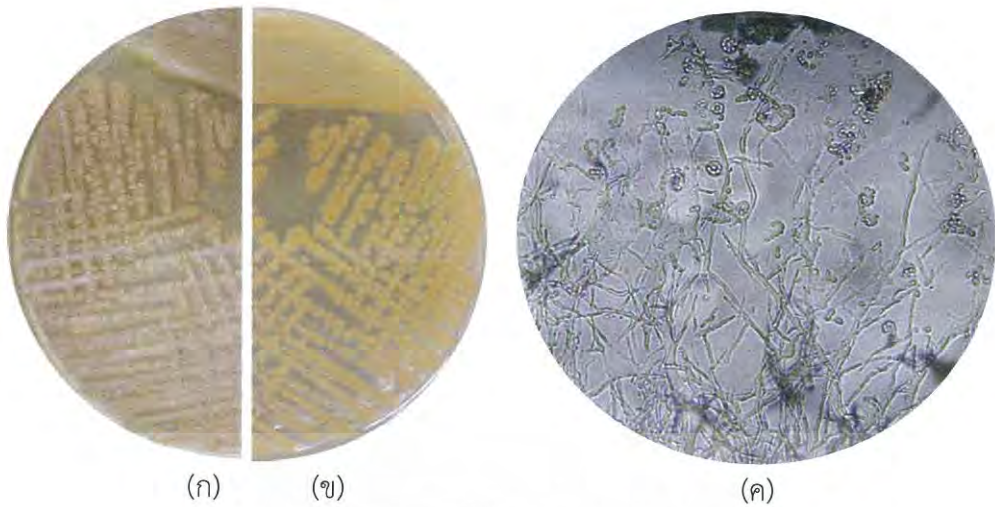
สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Eschehrichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-28

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-28 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-28 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-28 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

8.3 PMP22-36 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36

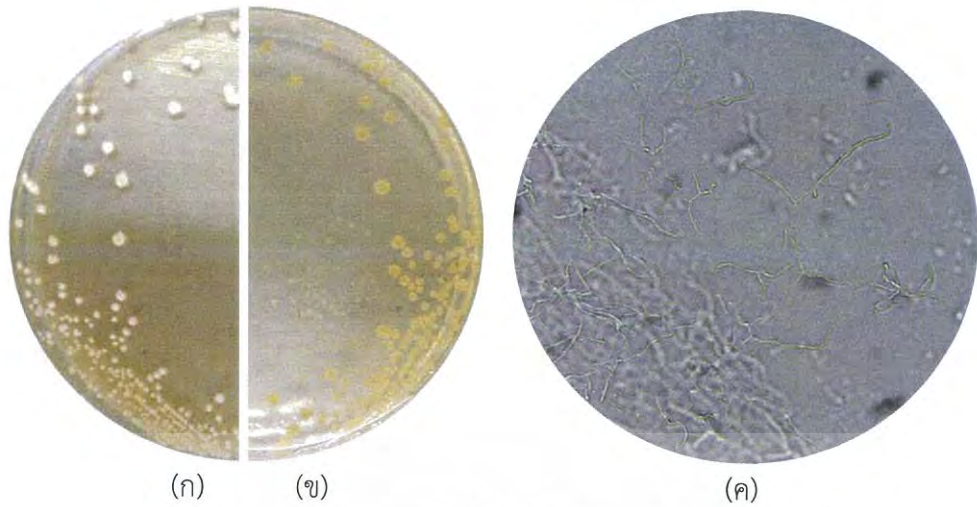
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Light Greenish Yellow มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Light Greenish มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.24-4.27, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย

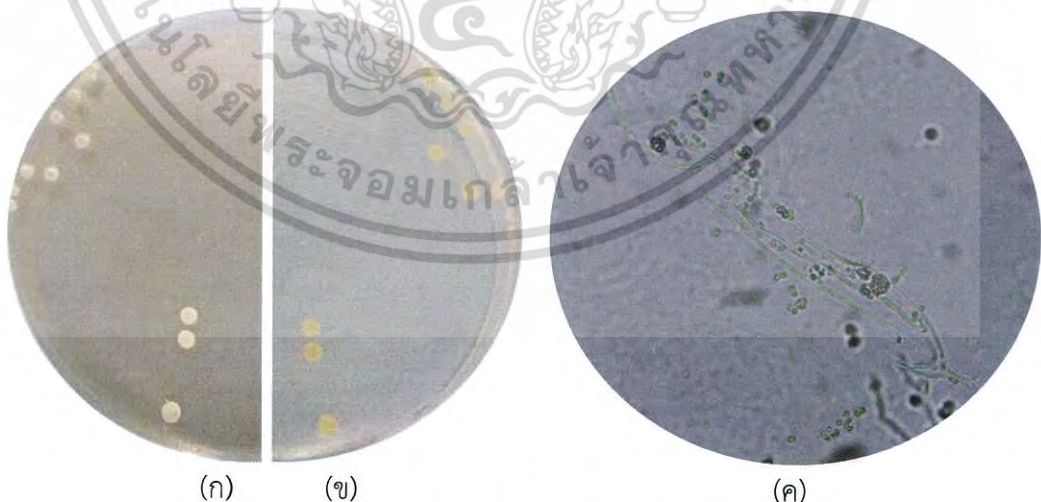
9.1 PMP22-39 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถย่อยเจลาติน แต่สามารถย่อยแป้งได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-39

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-39 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-39 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-39 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

9.2 PMP24-43 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาตินสามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP24-43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP24-43 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP24-43 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP24-43 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

9.3 PMP27-55 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยเจลาตินสามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)



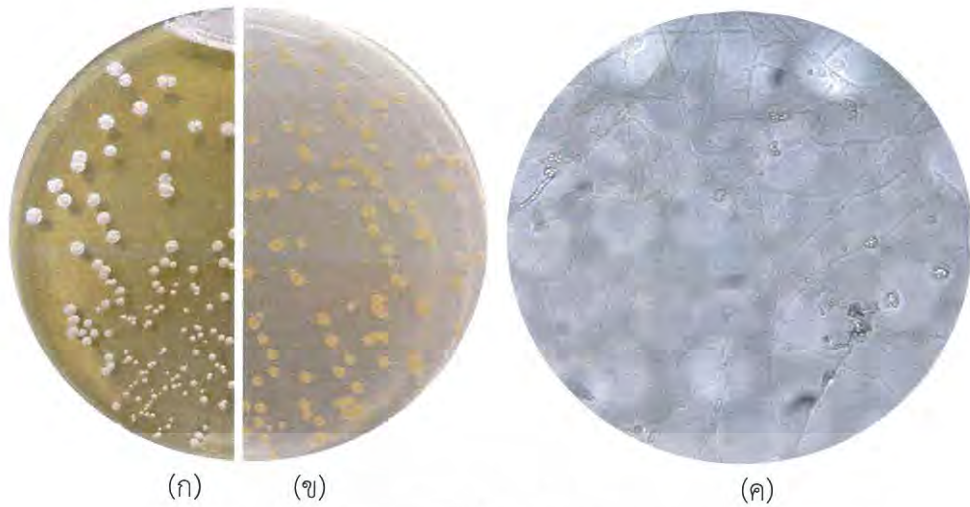
รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP27-55

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP27-55 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP27-55 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต PMP27-55 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

9.4 PMP28-58 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP28-58

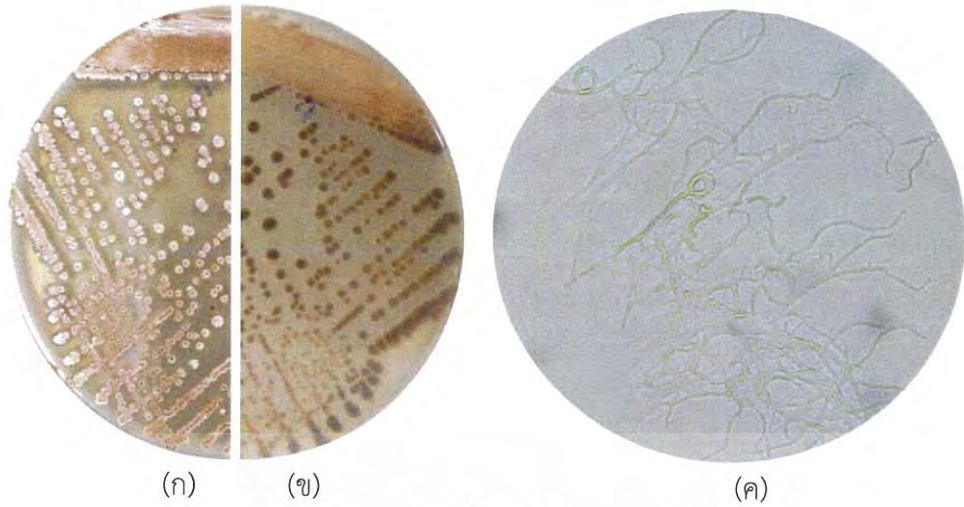
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP28-58 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP28-58 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP28-58 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 10 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Orange เส้นใยอาหารสี Deep Orange Yellow มีทั้งการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Light Greenish และไม่มี การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ รวมถึงมีการสร้างและไม่สร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.28-4.29, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย

10.1 PMP23-42 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนใน น้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



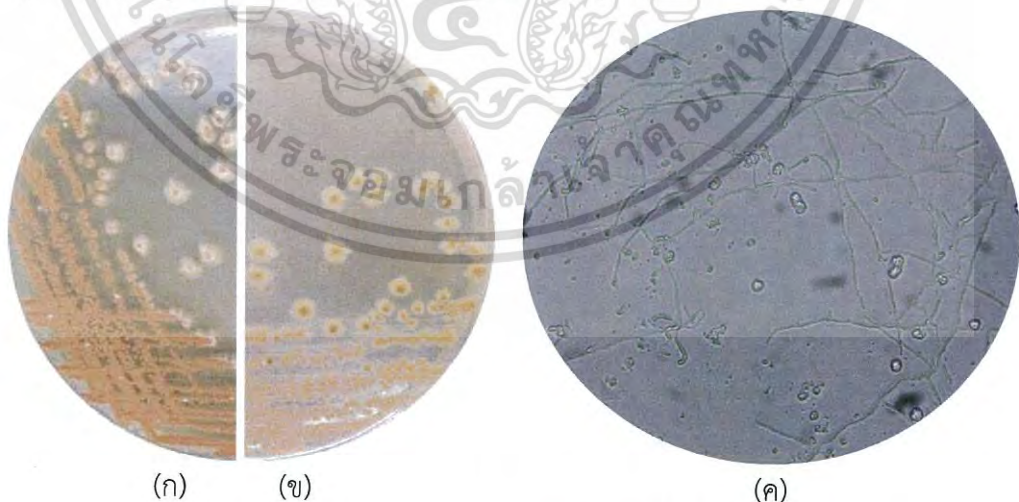
รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-42

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-42 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-42 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP23-42 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

10.2 PMP27-54 โดยไอโซเลตนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้ง แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารหุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP27-54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

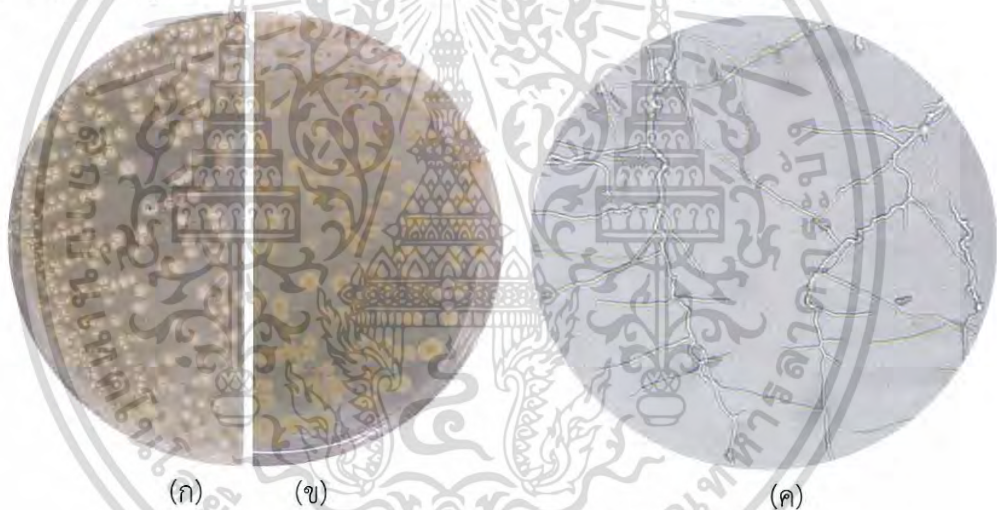
(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP27-54 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP27-54 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP27-54 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 11** เป็นกลุ่มของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียมที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Pink เส้นใยอาหารสี Greenish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.30, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย

11.1 PMP25-47 โดยไอโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถย่อยแป้งได้ แต่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนโตรเจน และสามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ (ตารางที่ 4.8)



**รูปที่ 4.30** แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP25-47

(ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP25-47 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

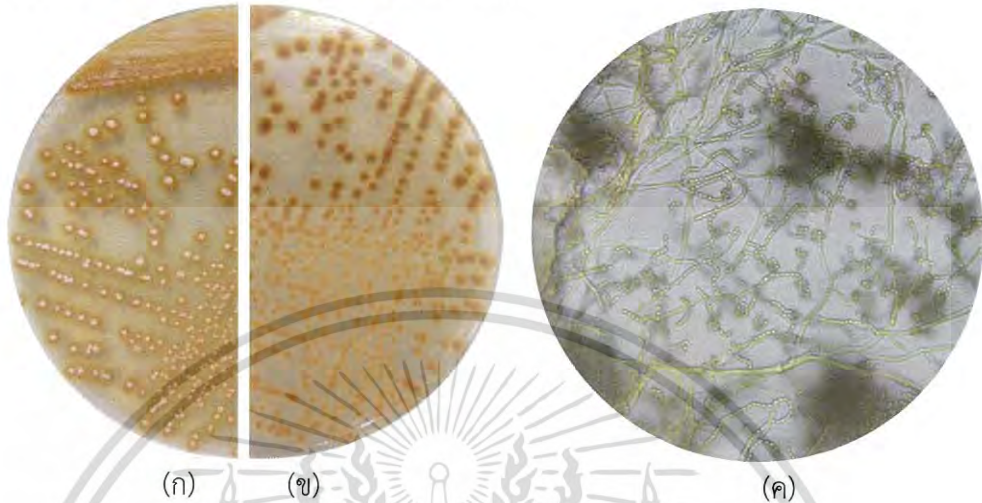
(ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP25-47 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) แสดงลักษณะเส้นใย ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียม PMP25-47 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

**กลุ่มที่ 12** เป็นกลุ่มของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮสโปเรียมที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow เส้นใยอาหารสี Deep Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ แต่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.31, ตารางที่ 4.6) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12.1 PMP26-50 โดยไฮโซเลตนี้ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ แต่สามารถย่อยแป้ง และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไฮโซเลต PMP26-50

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไฮโซเลต PMP26-50 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไฮโซเลต PMP26-50 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใย ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไฮโซเลต PMP26-50 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

#### 4.4 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

##### 4.4.1 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการทดสอบขั้นต้น

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต ถูกนำมาทำการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้านจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยใช้วิธีการทดสอบขั้นต้น (ดังวิธีการทดลอง 3.10) จากการทดสอบพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท 16 ไอโซเลต สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และมีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ทั้งหมด 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 36 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP9-11, PMP10-12, PMP11-21, PMP18-27, PMP18-28, PMP20-31, PMP21-33, PMP21-35, PMP22-36, PMP22-37, PMP24-43, PMP25-47, PMP27-55 และ PMP27-56
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ทั้งหมด 6 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 14 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP18-28, PMP20-31 และ PMP21-35
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 9 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27 และ PMP18-28
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ทั้งหมด 5 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP18-28 และ PMP21-33
5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ทั้งหมด 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 19 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP18-28, PMP21-34, PMP22-36 และ PMP22-37
6. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 10 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลต PMP11-21, PMP18-27, PMP18-28 และ PMP22-36

และจากการทดลองพบว่า

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ คิดเป็นร้อยละ 44
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ คิดเป็นร้อยละ 23
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ คิดเป็นร้อยละ 7
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ได้ คิดเป็นร้อยละ 26



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

หมายเลข ไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6633	TISTR 2374	TISTR 118	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 90028
PMP9-10	2.17	3.60	+	1.42	2.26	-
PMP9-11	4.54	-	-	-	-	-
PMP10-12	2.58	-	-	-	-	-
PMP10-13	-	-	-	-	-	-
PMP10-14	-	-	-	-	-	-
PMP11-21	16.25	+	+	+	+	+
PMP12-24	-	-	-	-	-	-
PMP18-26	-	-	-	-	-	-
PMP18-27	17.45	+	+	+	8.59	+
PMP18-28	+	+	+	+	+	+
PMP19-29	-	-	-	-	-	-
PMP19-30	-	-	-	-	-	-
PMP20-31	4.53	-	+	-	-	-
PMP20-32	-	-	-	-	-	-
PMP21-33	+	-	-	+	-	-
PMP21-34	-	-	-	-	+	-
PMP21-35	5.90	-	+	-	-	-
PMP22-36	7.11	-	-	-	+	+
PMP22-37	+	-	-	-	+	-
PMP22-38	-	-	-	-	-	-
PMP23-39	-	-	-	-	-	-
PMP23-40	-	-	-	-	-	-
PMP23-42	-	-	-	-	-	-
PMP24-43	4.75	-	-	-	-	-
PMP25-46	-	-	-	-	-	-

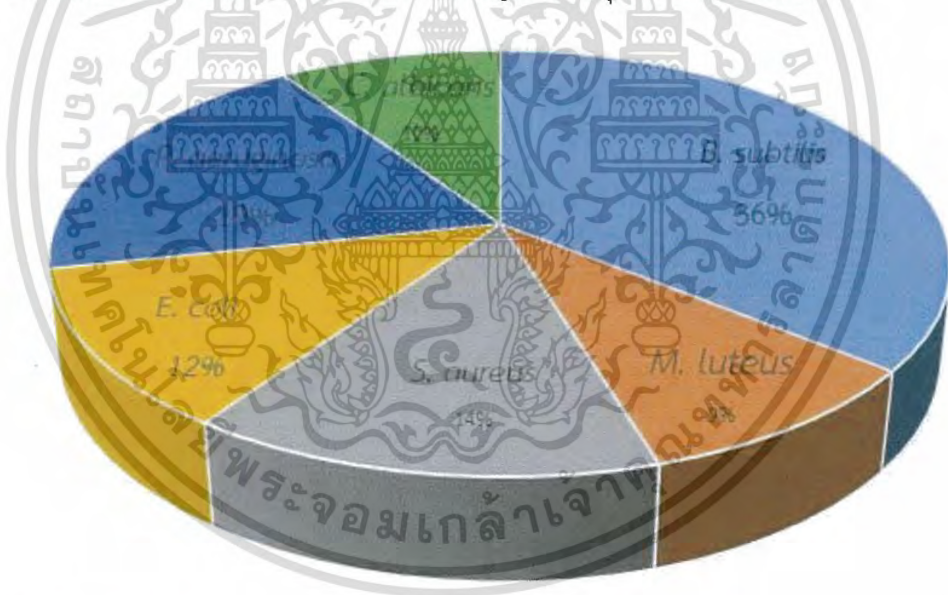
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลต	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ					
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6633	TISTR 2374	TISTR 118	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 90028
PMP25-47	3.89	-	-	-	-	-
PMP26-50	-	-	-	-	-	-
PMP27-54	-	-	-	-	-	-
PMP27-55	6.52	-	-	-	-	-
PMP27-56	+	-	-	-	-	-
PMP28-58	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (+) : เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้เล็กน้อย

(-) : เชื้อแอคติโนมัยซีทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ



รูปที่ 4.32 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ทดสอบโดยแอคติโนมัยซีท ด้วยการทดสอบเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค agar disc diffusion

จากผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการทดสอบขั้นต้น (จากผลการทดลองที่ 4.4.1) กับจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ได้ผลดังตารางที่ 4.8 พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทอยู่ 5 ไอโซเลต ที่ให้ผลในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมาก จึงได้นำทั้ง 5 ไอโซเลต นี้มาทำการทดสอบการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทิลอะซิเตต และการหมักด้วยเมทานอล จากนั้นทดสอบด้วยเทคนิค agar disc diffusion (ดังวิธีการทดลองที่ 3.11) กับจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิดข้างต้น พบว่าสารสกัดหมักในชั้นเอทิลอะซิเตต และเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัดหมักในชั้นของเอทิลอะซิเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลตที่เลือกมา สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27 และ PMP22-36 โดยไอโซเลต PMP22-36 สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ได้มากที่สุดถึง 14.02 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)

2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP11-21, PMP18-27 และ PMP 22-36 โดยไอโซเลต PMP11-21 สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้มากที่สุดถึง 8.22 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)

3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลต PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 โดยไอโซเลต PMP8-27 สามารถยับยั้ง *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้มากที่สุดถึง 11.00 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)

4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 โดยไอโซเลต PMP11-21 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้มากที่สุดถึง 11.96 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัดหยาบจาก เซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่สกัดด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลตที่เลือกมา สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP11-21 และ PMP21-35 โดยไอโซเลต PMP11-21 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้มากที่สุดถึง 13.92 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)

2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 ทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 โดยไอโซเลต PMP18-27 สามารถยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 ได้มากที่สุดถึง 8.47 มิลลิเมตร (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)



ตารางที่ 4.9 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

หมายเลข ไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร*)					
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> TISTR 2374	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
PMP9-10	11.65	8.85	-	11.76	-	-
PMP11-21	12.08	10.95	8.22	11.96	-	-
PMP18-27	8.17	11.00	8.20	11.25	-	-
PMP21-35	-	10.37	-	8.50	-	-
PMP22-36	14.02	10.91	7.83	11.63	-	-

หมายเหตุ \*รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) ขนาดของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้



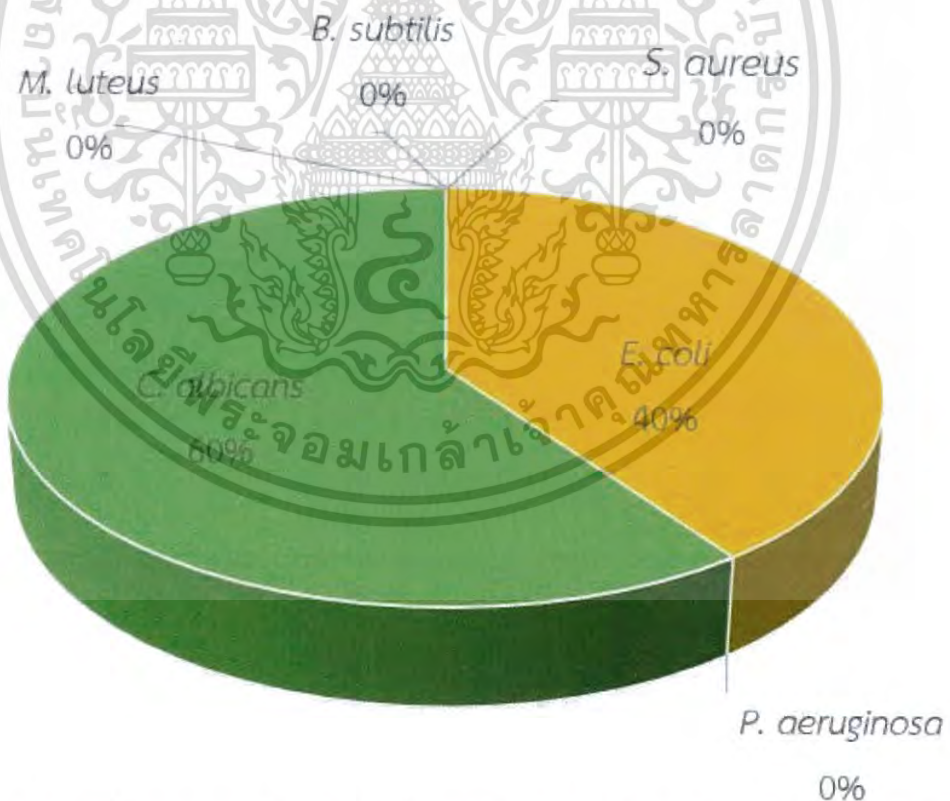
รูปที่ 4.33 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone, มิลลิเมตร*)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6633	TISTR 2374	TISTR 118	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 90028
PMP9-10	-	-	-	-	-	-
PMP11-21	-	-	-	13.92	-	-
PMP18-27	-	-	-	-	-	8.47
PMP21-35	-	-	-	11.07	-	7.48
PMP22-36	-	-	-	-	-	7.59

หมายเหตุ \*รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) ขนาดของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้



รูปที่ 4.34 แสดงร้อยละของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิค agar disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

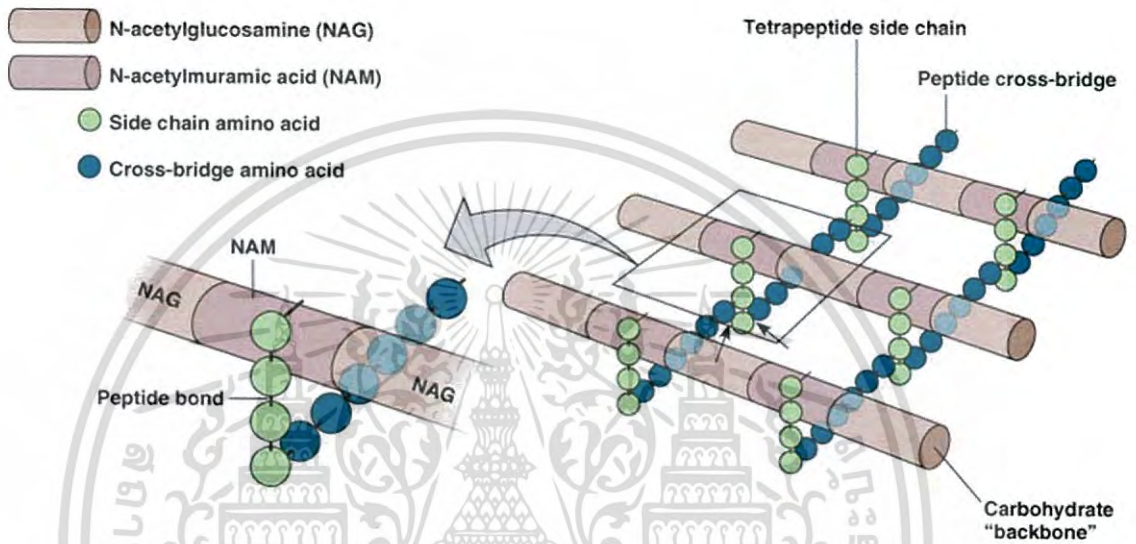
เชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลน ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และจากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนใหญ่จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (ดังตารางที่ 4.10) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sripreechasak *et al.* (2013) ที่รายงานว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินทางภาคใต้ของประเทศไทย สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* และ *Kocuria rhizophila* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และยีสต์ เช่น *Candida albicans* นอกจากนี้ยังมีรายงานของจิตติ (2550) ที่มีรายงานว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรีในประเทศไทย มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากการทดสอบเบื้องต้นที่พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทร้อยละ 36 จากแอกติโนมัยซีท 31 ไอโซเลตที่แยกได้ สามารถออกฤทธิ์ต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 ได้

สาเหตุที่เชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่เชื้อแอกติโนมัยซีทสร้างขึ้นมีความสัมพันธ์ขององค์ประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะจะมีทั้งการขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียรั่วและไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆได้ การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างสายเพปไทด์ การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกทำให้ไม่มีการอ่านรหัส (transcription) จากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ (ดูขนิ, 2555) และที่พบมากที่สุดคือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยสารต้านการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในช่วงระยะ log phase ของการเจริญของแบคทีเรีย โดยจะจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะเพปไทด์ (penta peptide) ในเพปติโดไกลแคน ทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) ซึ่งองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้นเพปติโดไกลแคนหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ (ดังรูปที่ 4.36A) จึงทำให้สารปฏิชีวนะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีชั้นของเพปติโดไกลแคนบาง และมีผนังชั้นนอกเป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) (ดังรูปที่ 4.36B) ส่วนในยีสต์ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (Eukaryote) องค์ประกอบของผนังเซลล์มักเป็นพวก glucan (D-glucose) และ mannan (D-mannose) (Carroll *et al.*, 2016) (ดังรูปที่ 4.37)

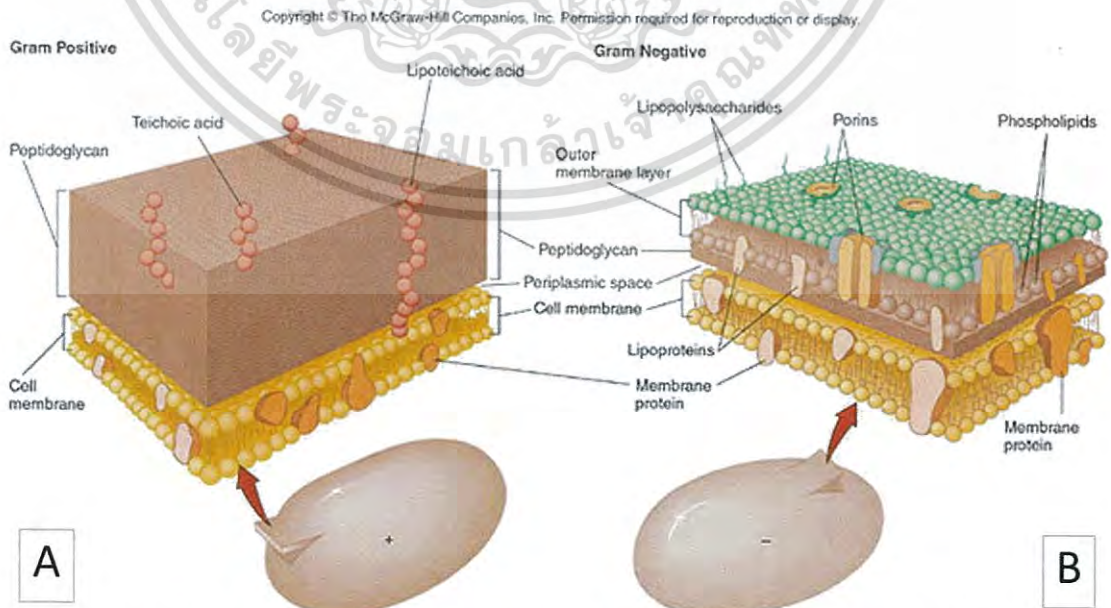
จากผลการทดลองด้วยการทดสอบเบื้องต้น และจากการทดสอบการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าสารทุติยภูมิที่เชื้อแอกติโนมัยซีทผลิตขึ้นนั้นอาจเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มบีตาแล็กแทม ( $\beta$ -lactam) เนื่องจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะมียวงแหวนที่เรียกว่า  $\beta$ -lactam เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (ดังรูปที่ 4.38) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์เพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป้าหมายของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนวสวหรัการรงงานเพอการศกษาเท่านั้น ไม่นุญตให้เนาเป็ขบประยชนดานการศกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อักทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่มนี้อยู่ที่ปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายกลุ่มเพปไทด์ (transpeptidation) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อ (cross-link) กันในกระบวนการสร้างเพปติโดไกลแคน ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียานั้นไม่สมบูรณ์และตายในที่สุด (รัตนภรณ์, 2548) (ดังรูปที่ 4.39) ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะในกลุ่ม  $\beta$ -lactam เช่น penicillins cephalosporins และ cephamycins โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้กับเซลล์ยูคาริโอต (อรอนงค์, 2555) และแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ (อิสยา และ วัชรินทร์, 2556)



รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะโครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย  
ที่มา : <http://vle.du.ac.in/mod/book/print.php?id=9126>  
ค้นเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ.2559



รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะโครงสร้างของเพปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม

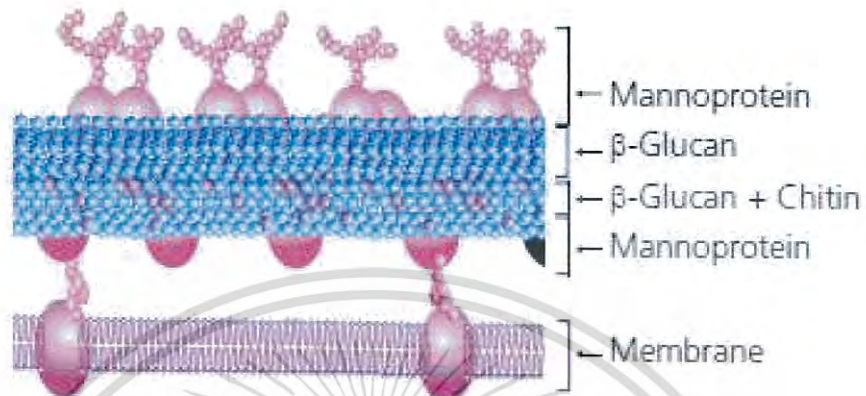
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A : แสดงลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

B : แสดงลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา : <http://healyourselfathome.com/MICROBES/BACTERIA/ABOUT.aspx>

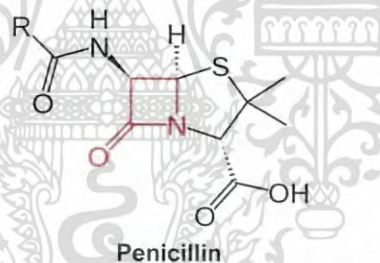
ค้นเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ.2559



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ของยีสต์

ที่มา : [http://distillique.co.za/distilling\\_shop/blog/96-basics-of-yeast-nutrients](http://distillique.co.za/distilling_shop/blog/96-basics-of-yeast-nutrients)

ค้นเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ.2559

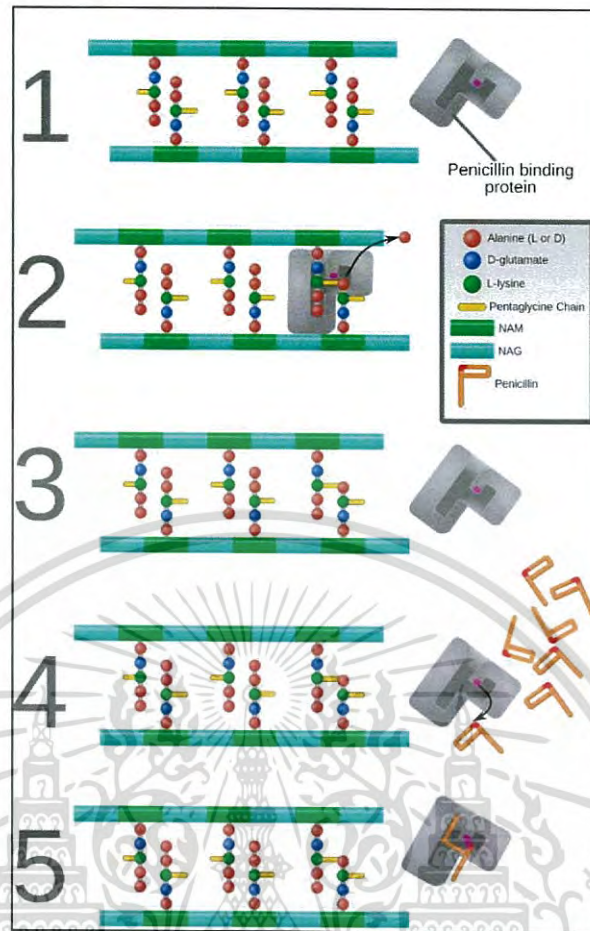


Penicillin

รูปที่ 4.38 โครงสร้างโมเลกุลของเพนิซิลิน ซึ่งมี  $\beta$ -lactam ring เป็นองค์ประกอบ

ที่มา : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00128/full>

ค้นเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ.2559



รูปที่ 4.39 กลไกการทำงานของเพนิซิลิน ซึ่งมี  $\beta$ -lactam ring เป็นองค์ประกอบ

ที่มา : [https://en.wikipedia.org/wiki/%CE%92-lactam\\_antibiotic](https://en.wikipedia.org/wiki/%CE%92-lactam_antibiotic)

ค้นเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ.2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

ในการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยเริ่มจากการตัดแยกเชื้อจากดินป่าชายเลนทั้งหมด 31 ไอโซเลต จากนั้นจัดกลุ่มแล้วคัดเลือกมา 5 ไอโซเลต ทำการแยกเชื้อจากอาหารแข็งมาลงอาหารเหลว YEME broth แล้วนำมาเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อ pre-germination (ดังวิธีการทดลองที่ 3.12.1) ก่อนที่จะถ่ายเชื้อไปเลี้ยงต่อในสภาวะเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่มากพอที่จะนำมาทำการศึกษาก่อนหน้านั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเลือกเก็บตะกอนเซลล์ใส่ลงใน micro centrifuge tube 2 หลอด หลอดที่ 1 นำไปสกัดสารสกัดหยาบ หลอดที่ 2 ซึ่งตะกอนเซลล์จากแต่ละตัวอย่างมา 100 มิลลิกรัม แล้วเอาไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่แล้ววัดค่าน้ำหนักแห้งของตะกอนเซลล์

ทำการสกัดฟอสโฟลิปิด (ดังวิธีการทดลองที่ 3.12.2) ที่อยู่ในผนังเซลล์ ด้วยการเติม คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการผสมเพื่อให้เซลล์แตก สุดท้ายทำการระเหยให้แห้ง นำส่วนที่เหลือมาทำการ resuspention ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 3 ไมโครลิตร และออบเปิดดูดสารที่ได้มาสปอต ลงในแผ่น TLC โดยช่องแรกของแผ่น TLC จะทำการสปอตสารมาตรฐานของฟอสโฟลิปิดที่สนใจ ลงไปสามชนิด คือ phosphatidylglycerol (PG) phosphatidylethanolamine (PE) และcardiolipin (CL) ใช้เป็น marker ในการเปรียบเทียบกับ unknown spot

mobile phase ที่ใช้คือคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 80/12/15/4 โดยปริมาตรตามลำดับจากนั้นนำแผ่น TLC ที่ Spot สารแล้วมาวางใน mobile phase ปล่อยให้สารเคลื่อนที่ขึ้นไปจนถึงประมาณ 3 ใน 4 ของขนาดแผ่น TLC จากนั้นนำออกมาแล้วปล่อยให้แห้งในแห้ง เมื่อแผ่น TLC แห้งแล้วจึงนำไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้เป็นเวลา 2-3 นาทีที่จะเห็นจุดสีฟ้าบริเวณที่มีสารตัวอย่าง ผลที่ได้จากทั้ง 5 ไอโซเลต แสดงในรูปที่ 4.45 จากนั้นทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆที่เกิดขึ้น แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า  $R_f$  โดยผลที่ได้จากทั้ง 5 ไอโซเลตนั้น เป็นดังตารางที่ 4.11

จากผลที่ได้บนแผ่น TLC สามารถอธิบายได้ตามรูปที่ 4.40 โดยช่องที่ 1 นั้นมีการจุดสารมาตรฐานเอาไว้ 3 ตัวคือ PG PE และ CL พบว่าจะเกิดสปอตขึ้น 3 สปอตคือ PG PE และ CL เรียงตามระยะการเคลื่อนที่จากน้อยไปหามากตามลำดับ ซึ่งจุดที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้อ้างอิงและระบุชนิดของสารตัวอย่างที่ทำการศึกษาก่อนเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตได้แต่ไม่จำเป็นว่าสปอตของสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างของเรานั้นจะต้องตรงกันอย่างพอดีเนื่องจากสารทั้งสองชนิดนั้นมาจากสิ่งมีชีวิตคนละชนิดกัน จึงเป็นเรื่องปกติที่ตำแหน่งของสปอตอาจจะคลาดเคลื่อนกันได้

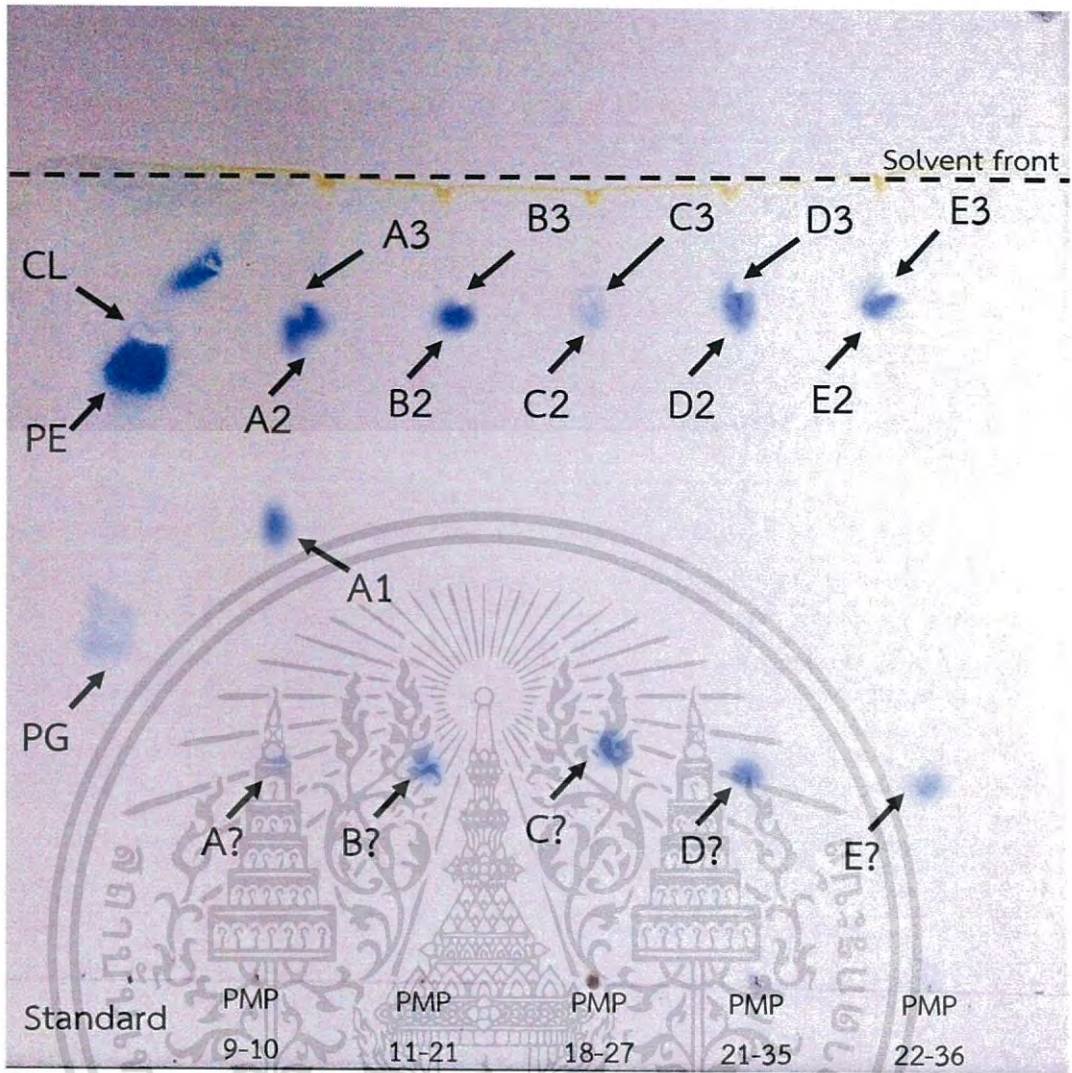
จากรูปที่ 4.45 คือผลจากการทำ TLC และทำการฉีดพ่นสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้เป็นเวลา 2-3 นาทีที่จะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ทั้ง 5 ไอโซเลต คือ PMP

9-10, PMP 11-21, PMP 18-27, PMP 21-35 และ PMP 22-36 พบว่า PMP 9-10 นั้นมีการสร้าง PE PG และ CL ส่วนอีก 4 ไอโซเลตที่เหลือคือ PMP 11-21, PMP 18-27, PMP 21-35 และ PMP 22-36 พบว่ามีการสร้าง PE และ CL จึงแสดงให้เห็นให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นมีการสร้าง CL ทุกไอโซเลต ซึ่งถ้าสังเกตจากตำแหน่งของ CL ของตัวอย่างเทียบกับตำแหน่งของสารมาตรฐานนั้นจะพบว่าจุดสีขาวยุติและสีฟ้าแทรกอยู่มีลักษณะ spot ที่จาง และไม่ชัดเจนซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ spot CL (Klanbut, 2013)

ในการคำนวณค่า rate of flow ( $R_f$ ) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่ เทียบกับ ระยะที่ตัวละลายเคลื่อนที่โดยใช้ mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม/เมทานอล/กรดอะซิติก/น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 80:12:15:4 โดยปริมาตร ตามลำดับซึ่งสารแต่ละชนิดนั้นจะมีค่า  $R_f$  คงที่เสมอ ดังนั้นค่า  $R_f$  จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร โดยการวัดระยะทางในการคำนวณค่า  $R_f$  จะเริ่มจาก จุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางของวงกลมสีที่ปรากฏเป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้และระยะทางจาก จุดเริ่มต้นถึง solvent front เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้จากนั้นจึงนำมาคำนวณดังนี้ (เผด็จ และคณะ, 2539)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

รูปที่ 4.40 เป็นรูปที่แสดงถึงการวัดระยะทางของ spot ในแต่ละไอโซเลต มีหลาย spot ตาม ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบโดยค่า  $R_f$  ของทุกไอโซเลตที่คำนวณได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 แต่จะ สังเกตได้ว่าค่า  $R_f$  ของสารละลายมาตรฐานจะมีค่าไม่ใกล้เคียงกับกับตัวอย่างในทุกไอโซเลต เนื่องมาจากสารดังกล่าวนั้นมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน แต่ค่า  $R_f$  ของทุกตัวอย่างไอโซเลตใน ฟอสโฟลิปิดชนิดเดียวกันนั้นจะมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันมาก เพราะว่ามีมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีท เหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.40 ถึงแม้ว่าค่า  $R_f$  นั้นจะไม่สามารถยืนยันได้ 100 % ว่าสารที่พบเป็น ฟอสโฟลิปิดจริงแต่เมื่อนำผลค่า  $R_f$  มาอ้างอิงประกอบกับตำแหน่ง standard phospholipid marker ก็ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า ตัวอย่างทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นมีฟอสโฟลิปิดชนิดใดอยู่บ้างและไอโซ เลตใดมีความน่าสนใจที่นำไปศึกษาต่อทางด้านดีเอ็นเอ หรือนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปใน อนาคต



รูปที่ 4.40 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีโดยเทียบกับสาร standard

ผลของการทำ thin layer chromatography เพื่อศึกษาฟอสโฟลิปิดจากหัวเชื้อแอกติโนมัยซีทในระยะ log phase ของตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 5 ไอโซเลต โดยในช่องที่ 1 มีการจุด spot standard phospholipids marker 3 ชนิด คือ cardiolipin, phosphatidylglycerol และ phosphatidylethanolamine ส่วนช่องที่ 2-6 เป็นการ spot สารสกัดจากหัวเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 โดยดูลำดับของการเคลื่อนที่ขึ้นกับ standard phospholipids marker (spot ของสารตัวอย่างและ standard จะไม่ตรงกันพอดี เนื่องจากฟอสโฟลิปิดที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตคนละชนิดกันจึงทำให้ระยะทางในการเคลื่อนที่ไม่เท่ากัน) แต่สามารถใช้ standard phospholipids marker เป็นตัวอ้างอิงได้ว่าสาร unknown ที่ทำการศึกษาอยู่เป็นฟอสโฟลิปิดชนิดเดียวกับ standard phospholipids marker จริง โดยเทียบกับตำแหน่งการวิ่งขึ้นของ standard

จากผลการทดลองการทำ thin layer chromatography รูปที่ 4.40 พบว่าในส่วนบนของช่องที่เป็นฟอสโฟลิปิดมาตรฐานบริเวณตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดชนิด CL มีการเกิดการเบี่ยงเบนของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spot ที่เกิดขึ้นทำให้ spot ของฟอสโฟลิปิดมาตรฐานชนิด CL ไม่สมบูรณ์ โดยลักษณะของ spot ของ cardiolipin ที่สมบูรณ์ จะต้องเป็น spot สีน้ำเงินและมีวงสีขาวแทรกอยู่ตรงกลางของ spot สีน้ำเงิน (Klanbut, 2013)

จากผลการทดลองการทำ thin layer chromatography รูปที่ 4.40 พบว่าฟอสโฟลิปิดชนิด cardiolipin พบในแอสโตโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลตที่ถูกเลือก เนื่องจากฟอสโฟลิปิดชนิดนี้จะพบมากในแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase (Ragolia and Tropp, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับหัวเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง และได้นำมาทำการสกัดฟอสโฟลิปิด นอกจากนั้น Tamburini และคณะ (2014) ได้กล่าวว่า ระยะ log phase ของเชื้อแอสโตโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะอยู่ในช่วง 10 – 24 ชั่วโมง ซึ่งในระยะ log phase แอสโตโนมัยซีทมีการแตกแขนง (branching) และมีการยืดยาวออกของปลายเส้นใย (hyphal tip) ซึ่งเป็นบริเวณที่พบ cardiolipin สะสมอยู่มาก (Klanbut, 2013) จึงสนใจศึกษาฟอสโฟลิปิดที่บริเวณนี้ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของชีวมวล (biomass) จึงนำไปสู่การเพิ่มของสารทุติยภูมิ (second metabolites) หลังจากเพิ่มปริมาณการเจริญของเซลล์แล้ว



ตารางที่ 4.11 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค thin layer chromatography และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวแทนเชื้อที่คัดเลือกมาทั้ง 5 ไอโซเลต

หมายเลขไอโซเลต	ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบ						น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม) จากน้ำหนักเซลล์เปียก 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	0.38	PE	0.67	CL	0.74	-
PMP9-10	A1	0.51	A2	0.73	A3	0.81	11
PMP11-21	-	-	B2	0.75	B3	0.81	20
PMP18-27	-	-	C2	0.75	C3	0.81	14
PMP21-35	-	-	D2	0.75	D3	0.81	9
PMP22-36	-	-	E2	0.76	E3	0.81	17

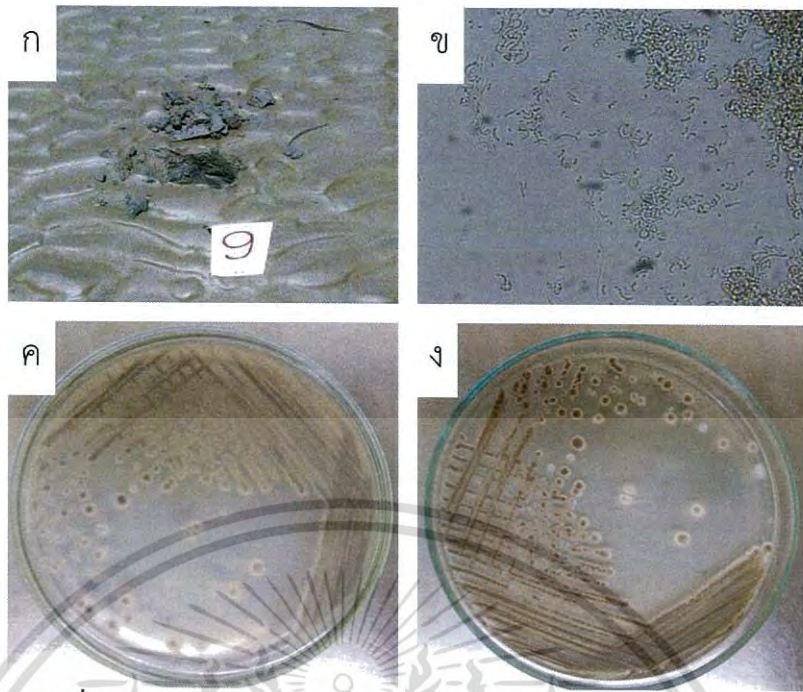
#### 4.6 รวมผลการทดลองของเชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต ที่ได้รับการคัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยการทดสอบเบื้องต้น สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตที่ให้ผลเด่นชัดได้ 5 ไอโซเลต มาทำการทดสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบโดยการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท และศึกษาฟอสโฟลิปิดที่แต่ละไอโซเลตสร้างขึ้น โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกได้ มีคุณสมบัติ ดังนี้

หมายเลขไอโซเลต PMP9-10 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถแยกเชื้อได้จากดินป่าชายเลนที่ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 (รูปที่ 4.41ก) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 4.8 เมตร (ตารางที่ 4.1) และเป็นดินที่มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้ น้ำหนักของดินบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 9 มีน้ำหนักดินอยู่ที่ 0.869 กรัม (ตารางที่ 4.3) ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 52.57 % (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ 6.89 (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำหมายเลขไอโซเลต PMP9-10 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Dark Reddish Brown เส้นใยอาหารสี Strong Reddish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ แต่มีการสร้างสปอร์รูปร่างแบบ ovoid บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.41ข-4.41ง, ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escehrichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8) จึงได้นำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดจากด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

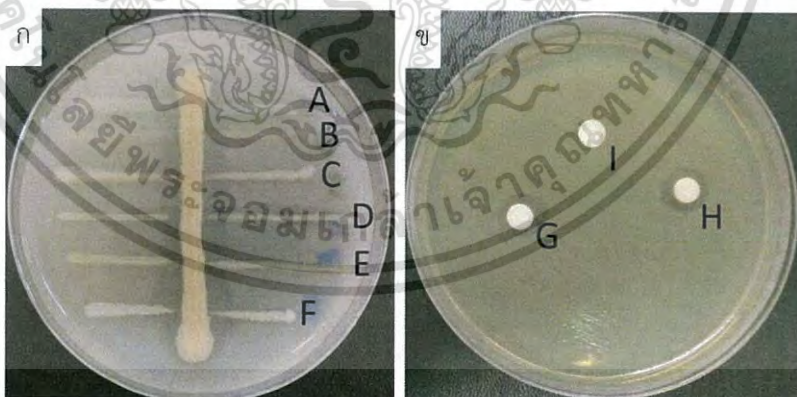
ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (มีบริเวณยับยั้ง 11.65 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 8.85 มิลลิเมตร) และ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง 11.76 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.9)

และเมื่อนำมาศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต PMP9-10 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (รูปที่ 4.40, ตารางที่ 4.11 )



รูปที่ 4.41 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP9-10

(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนที่ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า) (ค) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP9-10 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.42 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP9-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP9-10 : (A) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Candida albicans* ATCC 90028 (B) ผลการทดสอบบวก 2.26 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D) ผลการทดสอบบวก 1.42 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (E) ผลการทดสอบบวก 3.60 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (F) ผลการทดสอบบวก 2.17 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

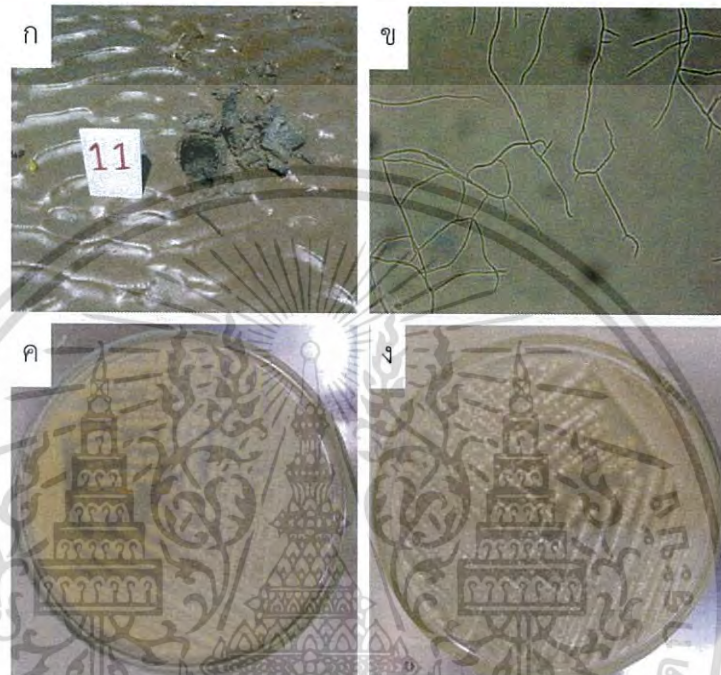
(ข) แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP9-10 ด้วยวิธี agar disc diffusion : (G,H) ผลบวกขนาด 11.48 และ 12.04 มิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (I) แผ่นทดสอบชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ ให้ผลลบกับ *Escehrichia coli* ATCC 25922

หมายเลขไอโซเลต PMP11-21 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถแยกเชื้อได้จากดินป่าชายเลนที่ตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 11 (รูปที่ 4.43ก) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 4.3 เมตร (ตารางที่ 4.1) และเป็นดินที่มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้ น้ำหนักของดินบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 11 มีน้ำหนักดินอยู่ที่ 0.821 กรัม (ตารางที่ 4.3) ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 49.32 % (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ 7.21 (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำหมายเลขไอโซเลต PMP11-21 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.43ข-4.43ง, ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า สามารถกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้ง แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escehrichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8) จึงได้นำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่า แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (มีบริเวณยับยั้ง 12.08 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 10.95 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (มีบริเวณยับยั้ง 8.22 มิลลิเมตร) และ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำเอกสารไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์โดยไม่ผ่านการพิจารณาจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

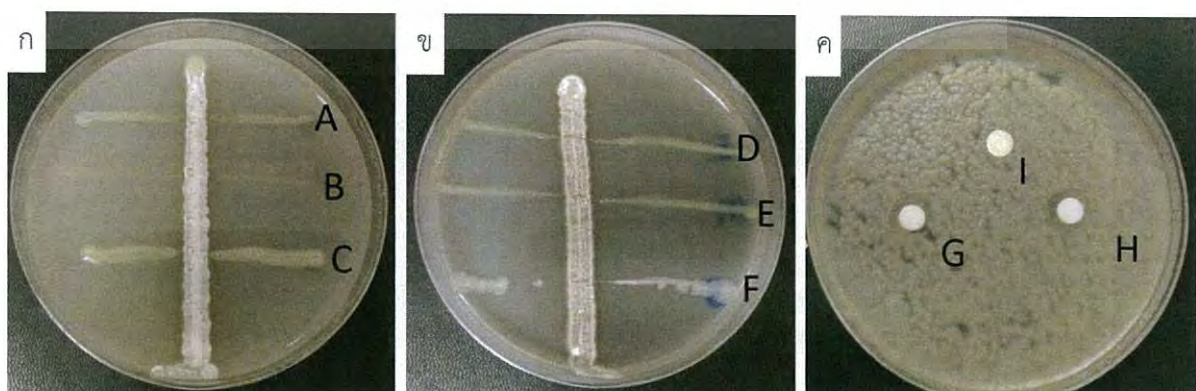
11.96 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.9) และสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยที่หมักด้วยเมทานอลที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง 13.92 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.10)

และเมื่อนำมาศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่าหมายเลขไอโซเลต PMP11-21 สามารถสร้าง phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (รูปที่ 4.40, ตารางที่ 4.11 )



รูปที่ 4.43 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP11-21

(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนที่ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ (ข) แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า) (ค) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP11-21 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.44 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP11-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) และ (ข) แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP11-21 : (A) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Candida albicans* ATCC 90028 (B) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (E) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (F) ผลการทดสอบบวก 16.25 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(ค) แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP11-21 ด้วยวิธี agar disc diffusion : (G,H) ผลบวกขนาด 12.41 และ 11.76 มิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (I) แผ่นทดสอบชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ให้ผลลบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

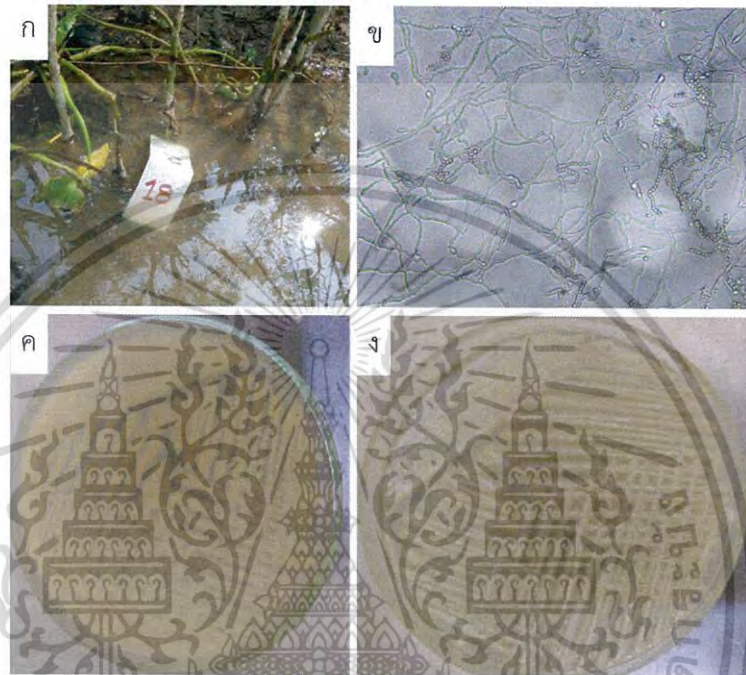
หมายเลขไอโซเลต PMP18-27 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถแยกเชื้อได้จากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 18 (รูปที่ 4.45ก) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 3.4 เมตร (ตารางที่ 4.1) และเป็นดินที่มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้ น้ำหนักของดินบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 18 มีน้ำหนักดินอยู่ที่ 0.66 กรัม (ตารางที่ 4.3) ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 43.81 % (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ 6.99 (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำหมายเลขไอโซเลต PMP18-27 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.45ข-4.45ง, ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า สามารถกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escehrichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8) จึงได้นำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่า แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (มีบริเวณยับยั้ง 8.17 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 11.00 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (มีบริเวณยับยั้ง 8.20 มิลลิเมตร), และ *Escehrichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

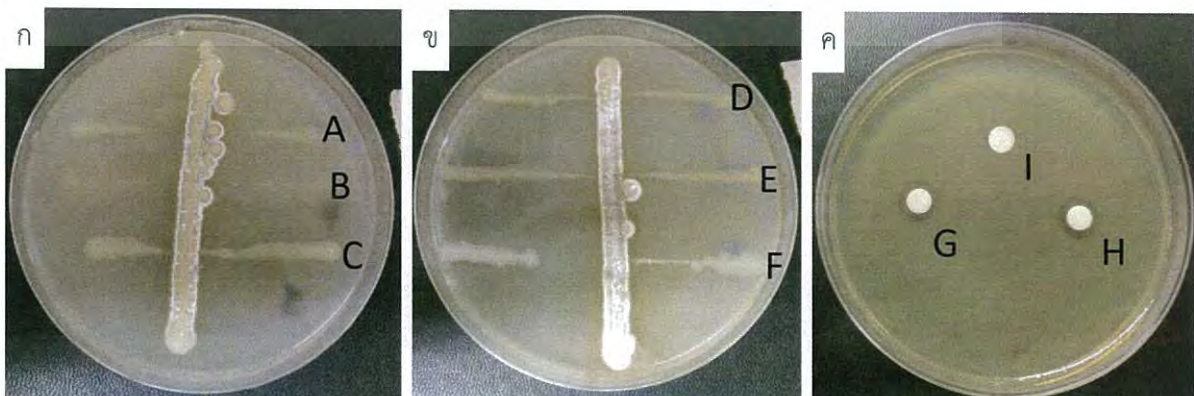
11.25 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.9) และสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยที่หมักด้วยเมทานอลที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 (มีบริเวณยับยั้ง 8.47 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.10)

และเมื่อนำมาศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่าหมายเลขไอโซเลต PMP18-27 สามารถสร้าง phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (รูปที่ 4.40, ตารางที่ 4.11 )



รูปที่ 4.45 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP18-27

(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (ข) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-27 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า) (ค) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-27 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP18-27 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.46 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP18-27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) และ (ข) แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP18-27 : (A) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Candida albicans* ATCC 90028 (B) ผลการทดสอบบวกขนาด 8.59 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Escherichia coli* ATCC 25922 (E) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (F) ผลการทดสอบบวก 17.45 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(ค) แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP18-27 ด้วยวิธี agar disc diffusion : (G,H) ผลบวกขนาด 11.00 และ 11.50 มิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (I) แผ่นทดสอบชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ให้ผลลบกับ *Escherichia coli* ATCC 25922

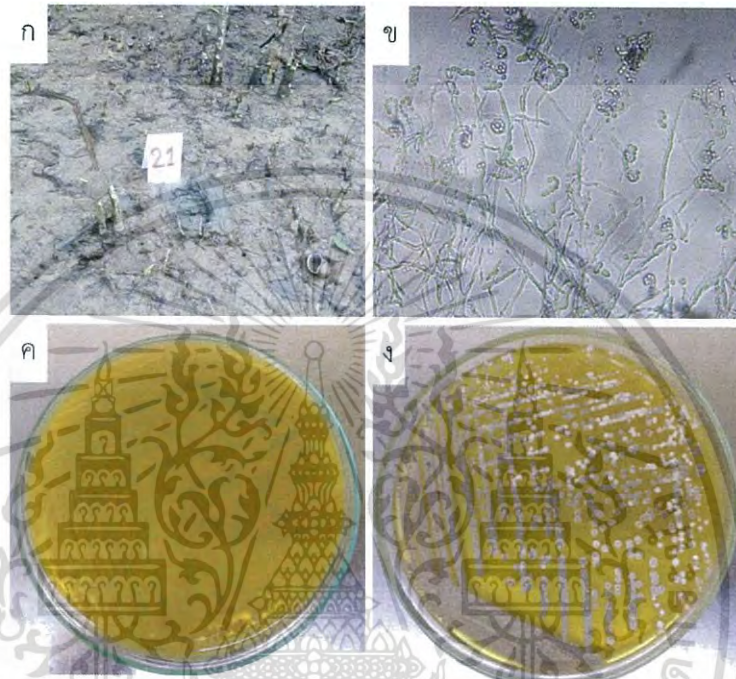
หมายเลขไอโซเลต PMP21-35 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถแยกเชื้อได้จากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 21 (รูปที่ 4.47ก) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.4 เมตร (ตารางที่ 4.1) และเป็นดินที่มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้ น้ำหนักของดินบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 21 มีน้ำหนักดินอยู่ที่ 0.277 กรัม (ตารางที่ 4.3) ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 45.77 % (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ 6.36 (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำหมายเลขไอโซเลต PMP21-35 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.47ข-4.47ง, ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า สามารถกักตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้ง แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้ (ตารางที่ 4.8) จึงได้นำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่า แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 10.37 มิลลิเมตร) และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง 8.50 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.9) และสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยที่หมักด้วยเมทานอลที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง 11.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

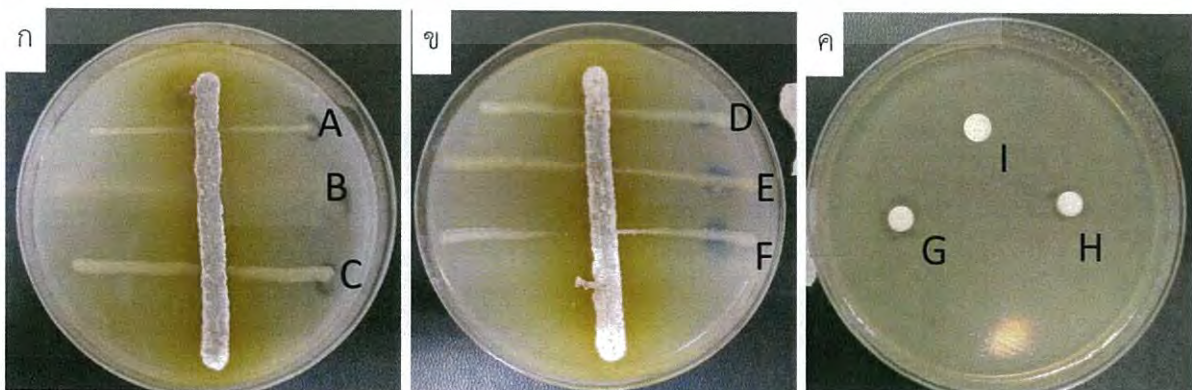
มิลลิเมตร) และ *Candida albicans* ATCC 90028 (มีบริเวณยับยั้ง 7.48 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.10)

และเมื่อนำมาศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่าหมายเลขไอโซเลต PMP21-35 สามารถสร้าง phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (รูปที่ 4.40, ตารางที่ 4.11 )



รูปที่ 4.47 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP21-35

(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (ข) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า) (ค) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต PMP21-35 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.48 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP21-35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) และ (ข) แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP21-35 : (A) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Candida albicans* ATCC 90028 (B) ผลการทดสอบลบจากการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Escherichia coli* ATCC 25922 (E) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (F) ผลการทดสอบบวก 5.90 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(ค) แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP21-35 ด้วยวิธี agar disc diffusion : (G,H) ผลบวกขนาด 9.97 และ 10.77 มิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากชั้นเอทิลอะซิเตตที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (I) แผ่นทดสอบชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ให้ผลลบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374

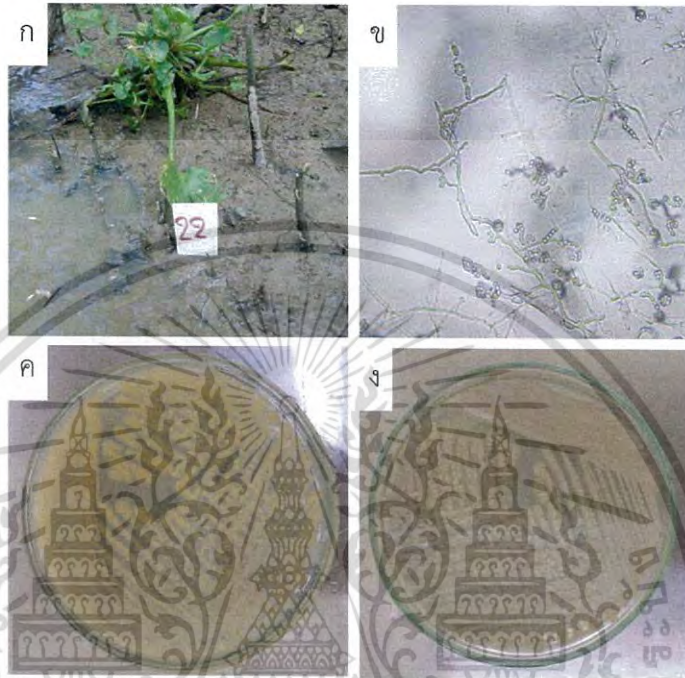
หมายเลขไอโซเลต PMP22-36 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถแยกเชื้อได้จากดินป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 22 (รูปที่ 4.49ก) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1.6 เมตร (ตารางที่ 4.1) และเป็นดินที่มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้ น้ำหนักของดินบริเวณจุดเก็บตัวอย่างที่ 22 มีน้ำหนักดินอยู่ที่ 1.4 กรัม (ตารางที่ 4.3) ปริมาณความชื้นอยู่ที่ 31.66 % (ตารางที่ 4.4) และค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ที่ 6.43 (ตารางที่ 4.5) เมื่อนำหมายเลขไอโซเลต PMP22-36 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์บนอาหาร ISP medium no.2 (รูปที่ 4.49ข-4.49ง, ตารางที่ 4.6) และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม สามารถย่อยแบ่งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.8) จึงได้นำสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่า แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (มีบริเวณยับยั้ง 14.02 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 10.91 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (มีบริเวณยับยั้ง 7.83 มิลลิเมตร), และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (มีบริเวณยับยั้ง 11.63 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.9) และสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

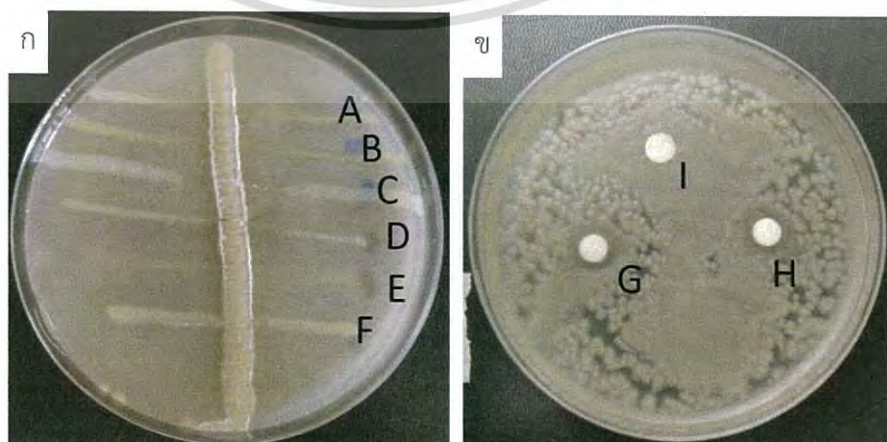
จากเซลล์และเส้นใยที่หมักด้วยเมทานอลที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 (มีบริเวณยับยั้ง 7.59 มิลลิเมตร) ได้ (ตารางที่ 4.10)

และเมื่อนำมาศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า PMP22-36 สามารถสร้าง phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (รูปที่ 4.40 , ตารางที่ 4.11)



รูปที่ 4.49 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต PMP22-36

(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (ข) แสดงลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า) (ค) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต PMP22-36 บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) ระยะเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.50 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP22-36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ หากมีการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต เจ้าของลิขสิทธิ์ขอสงวนสิทธิ์ในการดำเนินคดีตามกฎหมาย

(ก) แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP22-36 :  
 (A) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Candida albicans* ATCC 90028 (B) ผลการทดสอบบวก จากการทดสอบกับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (D) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Escherichia coli* ATCC 25922 (E) ผลการทดสอบลบ จากการทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (F) ผลการทดสอบบวก 7.11 มิลลิเมตร จากการทดสอบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(ข) แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต PMP22-36 ด้วยวิธี agar disc diffusion : (G,H) ผลบวกขนาด 14.65 และ 13.40 มิลลิเมตร ของสารสกัดหยาบจากชั้น เอทิลอะซิเตต ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (I) แผ่นทดสอบชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ให้ผลลบกับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการศึกษาฟอสโฟลิปิด และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และดินป่าชายเลนอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต จากจุดเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด (7 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลนตำบลบางปู จังหวัดสมุทรปราการ และ 24 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลนอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา) โดยบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6.36 - 7.35 มีค่าความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 47 และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท บนอาหาร Starch - Casein agar พบว่าเฉลี่ยแล้วเชื้อแอคติโนมัยซีทจะมีการเจริญและสร้างสปอร์ในระยะเวลา 10 - 14 วัน นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างสีของเส้นใยอากาศ และสีของเส้นใยอาหาร ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์และจับกลุ่มได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม (ตารางที่ 4.6)

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Dark Reddish Brown เส้นใยอาหารสี Strong Reddish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ แต่มีการสร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP9-10

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์บนอาหาร มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP9-11, PMP11-21, PMP18-26 และ PMP20-32

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Light Greenish Gray เส้นใยอาหารสี Vivid Yellow มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Brilliant Greenish มีการสร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP10-12, PMP20-31 และ PMP21-35

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pinkish Gray เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP10-13, PMP10-14 และ PMP19-30

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Very pale Purplish เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ สมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP12-24

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Very Pale Blue เส้นใยอาหารสี Moderate Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 7 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP19-29, PMP21-33, PMP22-37, PMP22-38, PMP23-40, PMP25-46 และ PMP27-56

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Dark Olive Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP21-34

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Pale Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP18-27, PMP18-28 และ PMP22-36

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยอาหารสี Light Greenish Yellow มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Light Greenish มีทั้งการสร้างและไม่สร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP22-39, PMP24-43, PMP27-55 และ PMP28-58

กลุ่มที่ 10 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Orange เส้นใยอาหารสี Deep Orange Yellow มีทั้งการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Light Greenish และไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ รวมถึงมีการสร้างและไม่สร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP23-42 และ PMP27-54

กลุ่มที่ 11 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Pink เส้นใยอาหารสี Greenish White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ สมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP25-47

กลุ่มที่ 12 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow เส้นใยอาหารสี Deep Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ แต่มีการสร้างสปอร์ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย PMP26-50

จากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.6) พบว่า การทดสอบการตกตะกอนของโปรตีนในหลอดอาหาร Skim milk 10% กว่าร้อยละ 65 ให้ผลการทดสอบการตกตะกอนของโปรตีนเป็น [ w ] คือมีการตกตะกอนของโปรตีนเล็กน้อยในหลอดอาหาร Skim milk 10% การทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar พบว่ากว่าร้อยละ 87 ให้ผลการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนเป็น [ - ] คือไม่มีการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar การย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth พบว่ากว่าร้อยละ 52 ให้ผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินเป็น [ - ] คือไม่มีการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth การย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth พบว่ากว่าร้อยละ 65 ให้ผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทเป็น [ - ] คือไม่มีการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth และการทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar พบว่ากว่าร้อยละ 61 ให้ผลการทดสอบการย่อยสลายแป้งเป็น [ + ] คือมีการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค agar disc diffusion โดยใช้เชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต คือ PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 ซึ่งได้จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ให้ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบดีที่สุด จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการทดสอบขั้นต้น (ตารางที่ 4.8) โดยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้มากที่สุดโดยสามารถคิดได้เป็นร้อยละ 29 สำหรับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 คิดเป็นร้อยละ 24 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 คิดเป็นร้อยละ 18 ส่วน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ไม่สามารถยับยั้งได้ โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลต PMP11-21, PMP18-27 และ PMP22-36 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ถึง 4 ชนิด (ตารางที่ 4.9) ซึ่งสามารถยับยั้งได้มากที่สุดจากเชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดหยาบจากเซลล์และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทที่หมักด้วยเมทานอล ในระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.10) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยคิดเป็นร้อยละ 60 และสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ร้อยละ 40 โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลต PMP21-35 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ถึง 2 ชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งได้มากที่สุดจากเชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต

จากการศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีท (ตารางที่ 4.11) โดยการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้เชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต คือ PMP9-10, PMP11-21, PMP18-27, PMP21-35 และ PMP22-36 พบว่าแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลต PMP 9-10 นั้นสามารถสร้างฟอสโฟลิปิด ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylglycerol และ Cardiolipin ส่วนแอกติโนมัยซีทหมายเลขไอโซเลต PMP 11-21, PMP 18-27, PMP 21-35 และ PMP 22-36 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิด ได้เพียง 2 ชนิด คือ Phosphatidylethanolamine และ Cardiolipin

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน 2 แหล่ง ได้เป็นจำนวนมาก จึงควรมีการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินที่ไม่ใช่ดินจากป่าชายเลน เพื่อจะได้นำมาเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีท ว่าแต่ละแหล่งมีความเหมือนและความแตกต่างกันอย่างไรบ้าง

5.2.2 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับสกุลและสปีชีส์เพื่อที่จะได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อหรือทำการศึกษายีนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ในระดับจีโนมไทป์ เพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวล ซึ่งนำไปสู่การสร้างสารทุติยภูมิให้มากขึ้นด้วย และควรมีการศึกษาเพิ่มถึงการหาปัจจัยหรือสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีท เพื่อที่จะทำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณที่มากขึ้น

5.2.3 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สามารถสกัดฟอสโฟลิปิดที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดต่างๆ แต่ได้ใช้ฟอสโฟลิปิดมาตรฐานเพียง 3 ชนิด เท่านั้น จึงควรมีการเพิ่มชนิดของฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน เพื่อที่จะได้รู้ว่าแอกติโนมัยซีทที่สามารถคัดแยกได้สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิดไหนได้บ้างและช่วยในการจำแนกเอกลักษณ์ของ unknown spot

5.2.4 จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ทำเพียงแค่ทดสอบสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ เท่านั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มเชื้อทดสอบ อย่างเช่น รา เพื่อที่จะทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์มากขึ้น และสามารถนำประโยชน์จากการวิจัยมาประยุกต์ใช้ได้มากขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับสมาคมผู้ค้าผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและอาหารเยือกแข็งแห่งประเทศไทย. 2534. เอกสารประกอบคำบรรยาย การประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยา และข้อกำหนดคุณภาพมาตรฐานอาหารแช่แข็งเพื่อการส่งออก. กรุงเทพฯ.

กึ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในดิน. อดุทธธานี : สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

คนาวรรณ พจนาคม และ นันคนา บุรณะโอสถ. 2547. “เภสัชเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides.” ไทยเภสัชนิพนธ์ 1: 65-74.

งามนิจ นนทโส. 2547. การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากดิน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จิตติ ท่าไว. 2550. การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดิน. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตติ ท่าไว. 2552. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และอนุกรมวิธานของแอกติโนมัยซีทส์ที่แยกจากดินภูเขาทางภาคตะวันตกและดินป่าชายเลน. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณภัทร ศิลปคร. 2553. การพัฒนาหลักสูตรท้องถิ่น เรื่อง สัตว์ที่อาศัยในระบบนิเวศป่าชายเลน ตำบลปากทะเล อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี โดยกระบวนการวิจัยเชิงปฏิบัติการอย่างมีส่วนร่วม. เพชรบุรี : สาขาวิชา การบริหารการศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.

ดุขณี ณะบริพัฒน์. 2555. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : หจก. วี.เจ.พรินต์ติ้ง.

ธีรวรรณ บุญโทแสง. 2550. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์เสทเทอโรโทรฟิคแอโรบในหลุมฝังขยะสดที่ใช้พื้นที่ป่าชายเลนของแหลมผักเบี้ยจังหวัดเพชรบุรี. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาลัยสิ่งแวดล้อม สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2557. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นริศ เกื้อกุลพัฒนา, จักตุรงค์ โอวาท และพีระพล ทองหาญ. 2557. “การศึกษาฟอสโพลิปิดและการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทส์ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี.” ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2539. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนส์ไตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- บงกชวรรณ สุตะวรรณ. 2550. การตรวจพิสูจน์เชื้อราก่อโรคทางห้องปฏิบัติการ. โครงการส่งเสริมงานแต่งตำราคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เผด็จ สิทธิสุนทร และคณะ. 2539. คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มลลัวธู เอื้อพรหมมาต, ศศิธร อำนาจรุ่งตระกูล และอารีวัลย์ วนาอุปลัมภกุล. 2545. การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดิน. ปรินูญยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ), สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์. 2548. แอกติโนมัยซีท. ชลบุรี : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ. 2551. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. หน้า 2-4 [Online]. Available : <http://www.hospital.tu.ac/LABWEBSITE/Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf>
- วิวัฒน์ หันบุญญิต และเอกภพ สกุกกิจกาญจน์. 2549. “การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกจากป่าชายเลน.” ปรินูญยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สำนักงานนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. 2556. สถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศไทย. [Online]. Available: <http://narst.dmsc.moph.go.th/news001.html>
- สุรีย์ นานาชาติ. 2557. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2555. จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค. กรุงเทพฯ : จรัสสินทรวงศ์การพิมพ์.
- อิสยา จันทรวิธานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2556. แบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., and Hentschel, U. 2015. “Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes.” *Biotechnology Advances* 33 : 798-811.
- Arai, T. 1975. Culture media for Actinomycetes. The Society for Actinomycetes. Japan : Asakura Publishing.
- Arasu, M. V., Agastian, P., Duraipandiyar, V. Al-Dhabi, N.A., Muthukumar, C., Ignacimuthu, S. and Kim, S. J. 2013. “Growth inhibitory potential of polyene type metabolite producing *Streptomyces speibonae* ERI-01.” *African Journal of Microbiology Research*. 7(27) : 3547-3555.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Moisture in Animal feed. (7.007) Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content ISO 6496.
- Atlas, R. M. 1993. **Handbook of Microbiological Media**. Florida : CRC Press. Pp.174.
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S. and Augustine, N. 2014. “Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*. n.d.: 1-8.
- Baskaran, R., Mohan, P. M., Vijayakumar, R. and Sachithanandam. 2015. “Chapter 22 – Diversity of Antagonistic *Streptomyces* Species in Mangrove Sediments of Andaman Island, India.” *Marine Faunal Diversity in India*. : 395-420.
- Bizuye, A., Moges, F. and Andualem, B. 2013. “Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia.” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 3(5) : 375-381.
- Blanco, E. M., Little, C. R. and Baines, A. L. D. 2007. “Variation in antibiotic inhibitory abilities among *Streptomyces* from south Texas agricultural soils.” *Soli Biology & Biochemistry* 39 : 268-275.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioa, S., Zerizer, H., Couble, A., Mouniee, D., Bpulahrouf, A., Boiron, P. 2005. “Isolation and molecular indentification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, FL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains.” *J. Med. Mycol.* 15 : 39-44.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. 2005. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2 The Proteobacteria. 2<sup>nd</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. and Miller, S. 2016. **Medical Microbiology**. 27<sup>th</sup> ed. China : McGraw-Hill Education.
- Castillo, M.A., Felis, N., Aragon, P., Cuesta, G. and Sabater, C. 2006. “Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil.” *International Biodeterioration & Biodegradation* 58 : 196-202.
- Doumbou, C. L., Salove, M. K. H., Crawford, D. L., and Beaulieu, C. 2001. “Actinomycetes, promising tools to control plant disease and to promote

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- plant growth.” Department of microbiology, molecular biology and biochemistry, University of Idaho, Moscow, USA.
- El-Naggar, N. E., Abdelwahed, N. A.M., Saber, W. I.A. and Mohamed, A. A. 2014. “Bioprocessing of some agro-industrial residues for endoglucanase production by the new subsp.; *Streptomyces albogriseolus* subsp. cellulolyticus strain NEAE-J.” *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(2).
- Flardh, K. 2010. “Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*.” *Current Opinion in Microbiology* 13 : 758-765.
- 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. 2<sup>nd</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M. 1988. *Actinomyces in biotechnology*. Academic Press Limited, London. 501 p.
- Govindarajan, G., Santhi, V. S. and Jebakumar, S. R. D. 2014. “Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin.” *Biologicals*. 42(6) : 305-311.
- Heber, S. and Tropp, B.E. 1991. *Biochim. Biophys. Acta* 1129, 1-12.
- Hodgson, D. A. 2000. “Primary Metabolism and its Control in Streptomycetes: A Most Unusual Group of Bacteria.” Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, US.
- Holzapel, W.H. 1995. “Chapter 7 Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria.” *Progress in Industrial Microbiology*. 34 : 89-109.
- Kafilzadeh, F. and Dehdari, F. 2015. “Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran.” *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 41(2) : 197-201.
- Klanbut, K. 2013. “The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*.” Strathclyde Institute of Pharmacy and Biochemical Sciences, Glasgow, United Kingdom.
- Küster, E. & Williams, S.T. 1964. “Selection of media for isolation of streptomycetes.” *Nature*. 202 : 928-929.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lechevalier, M. P., Bievre, C. D. and Lechevalier, H. 1977. "Chemotaxonomy of Aerobic Actinomycetes: Phospholipid Composition." *Biochemical Systematics and Ecology*. 5 : 249-260.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K. 2013. "Marine actinobacterial metabolites: Current and future perspectives." *Microbiological Research* 168 : 311-332.
- Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I. and Abdelwouhid, D. E. 2015. "Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(6) : 438-445.
- Migueluez, E. M., Rueda, B., Hardisson, C. and Manzanal, M. B. 1997. "Colony development in *Streptomyces carpinensis* : a streptomycetes with substrate mycelium spores." *FEMS Microbiology Letters* 157 : 103-107.
- Mundie, D.A. 1995. The NBS/ISCC Color system / David A. Mundie Pittsburgh, PA: Polymath Systems 535.6 dc-20 ( <http://anthus.com/Colors/Cent.html>, lastaccess February 2006).
- Okada, M., Hisajima, T., Ishibashi, H., Miyasaka, T., Abe S., and Satoh, T. 2013. "Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissue of a murine oral candidiasis model in the early infection stage." *SciVerse ScienceDirect* : 444-450.
- Ragolia, L. and Tropp, B., E. 1994. "The effects of phosphoglycerides on *Escherichia coli* cardiolipin synthase." *Biochimica et Biophysica Acta* 1214 : 3223-332.
- Renna, M., S., Figueredo, C. M., Rodríguez-Galán, M. C., Icely, P. A., Cejas, H., Cano, R., Correa, Sotomayor, C. E. 2015. "*Candida albicans* up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells." *Immunobiology*. 220 : 1210-1218.
- Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B., and Manhas, R. K. 2011. "Antimicrobial activity of Actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10 (6): 801-808.
- Sigle, S., Ladwig, N., Wohlleben, W. and Muth, G. 2014. "Synthetic of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*." *International Journal of Medical Microbiology*. n.d.

- Singh, S., Kumar, P., Gopalan, N., Shrivastava, B., Kuhad, RC. and Chaudhary, H. S. 2012. "Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. n.d. : 1147-1150.
- Sripreechusak, P., Tanasupawat, S., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Suwanborirux, K. and Takahashi, Y. 2013. "Identification and antimicrobial activity of actinobacteria from soils in southern Thailand." *Trop Biomed*. 30(1) : 46-55.
- Tamburini, E., Perito, B. and Mastromei, G. 2004. "Growth phase-dependent expression of and endoglucanase encoding gene (eglS) in *Streptomyces rochei* A2." *FEMS Microbiology Letters*. 237(2) : 267-272.
- Tan, B.K., Bogdanov, M., Zhao, J., Dowhan, W., Raetz, C.R.H. and Guan, Z. 2012. "Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates." *PNAS*. 109(41) : 16504-16509.
- Valan, A. M., Ignacimuthu, S. and Agastian, P. 2012. "Actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu with its antimicrobial properties." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. : 5830-5837.
- Vengadesh, P. K., Sundaramoorthi, C., Gupta S., Karthick, K. and Tamilselvi, N. 2011. "Production and Characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes." *JRJP* 2 (4) : 114-118.
- Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. and Whitman, W. B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3. 2<sup>nd</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., and Stackebrandt, E. 2009. "An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 : 589-608.
- Zotchev, S. B. 2012. "Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines." *Journal of Biotechnology* 158 : 168-175.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

## 1. Stach – Casein agar (Küster&amp; Williams,1964)

Soluble starch	10.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	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
NaCl	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

## 2. Muller Hinton Agar (MHA)

Beef Extract	2.00	กรัม
Acid Hydrolysate of Casein	17.50	กรัม
Starch	1.50	กรัม
Agar	17.00	กรัม
pH 7.2-7.4		

## 3. Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Skim milk agar (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

Skim milk powder	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		

5. Skim milk 10% (วิวัฒน์ และเอกภพ, 2549)

Skim milk powder	20.0	กรัม
------------------	------	------

6. Bouillon gelatin broth (Arai, 1975 )

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

7. 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		

8. ISP medium no.4 (Inorganic salt-starch agar : HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, SwastikDishaBussiness 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
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	2.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaCl	1.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0 – 7.4		
Trace salt 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

9. Tryptic soy agar (TSA : Sisco research laboratories Pvt. Ltd (SRL), India)

Pancreatic Digest of Casein	15.0	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
pH 7.3 -7.5		

10. Sabouraud dextrose agar (SDA : : HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, SwastikDishaBusiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

Dextrose	40.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 5.4 – 5.8		

11. International 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		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 12. 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

## การคำนวณคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจาก (AOAC,1990)

## วิธีคำนวณน้ำหนักดิน

ตัวอย่างดิน จุดที่ 1

น้ำหนักปีกเกอร์	28.994	กรัม
น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ $10^{-1}$ ก่อนอบ	6.741	กรัม
น้ำหนักของสารแขวนลอยของดินและปีกเกอร์หลังอบ	29.305	กรัม

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

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักของปีกเกอร์และดินก่อนอบ} &= \text{น้ำหนักปีกเกอร์ (กรัม)} + \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่} \\ &\hspace{15em} \text{ความเจือจางที่ } 10^{-1} \text{ ก่อนอบ} \\ &= 28.994 + 6.741 \hspace{15em} \text{กรัม} \\ &= 35.735 \hspace{15em} \text{กรัม} \end{aligned}$$

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม) จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณน้ำหนักดิน (กรัม)} &= \text{น้ำหนักสารแขวนลอยดินและปีกเกอร์ก่อนอบ} - \\ &\hspace{15em} \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและปีกเกอร์หลังอบ} \\ &= 35.735 - 29.305 \hspace{15em} \text{กรัม} \\ &= 6.430 \hspace{15em} \text{กรัม} \end{aligned}$$

ตัวอย่างดินจุดที่ 1 มีปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อเท่ากับ 6.430 กรัม

## วิธีการคำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน

ตัวอย่างดิน : จุดที่ 1

น้ำหนักปีกเกอร์	28.171	กรัม
น้ำหนักดินก่อนอบ	1.844	กรัม
น้ำหนักดินและปีกเกอร์หลังอบ	29.725	กรัม

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินหลังอบ (กรัม) จาก

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักดินหลังอบ(กรัม)} &= \text{น้ำหนักดินและปีกเกอร์หลังอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักปีกเกอร์ก่อนอบ} \\ &= 29.725 - 28.717 && \text{กรัม} \\ &= 1.008 && \text{กรัม} \end{aligned}$$

คำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน ( % ) จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณความชื้นในดิน ( % )} &= \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักของดินหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)}} \times 100 \% \\ &= \frac{1.844 \text{ กรัม} - 1.008 \text{ กรัม}}{1.844 \text{ กรัม}} \times 100 \% \\ &= \frac{0.836 \text{ กรัม}}{1.844 \text{ กรัม}} \times 100 \% \\ &= 45.37 \% \end{aligned}$$

ตัวอย่างดินจุดที่ 1 มีปริมาณความชื้นในดิน ( % ) เท่ากับ 45.37%

## ภาคผนวก ค

## กระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)

(Mundie,1995)

ตารางที่ ก 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					
v.R 11 Vivid Red	(1-9R) 5R3.9/15.4 OUT	#C10020		#BE0032	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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					
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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					
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ดูแลเห็นแจ้งขอรับระเบียนด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

d.gY 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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

gy.OIG 127 Grayish Olive Green	(2-8GY) 4.6GY3.5/2	#48442D		#515744	
d.gy.OIG 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.lyG 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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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-10BG) 8.7G1/0.7	#181513	#1E2321	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	


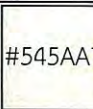

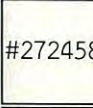

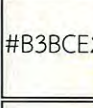

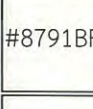

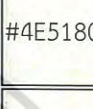

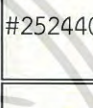

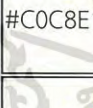

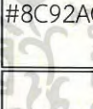

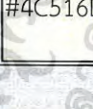

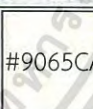

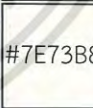

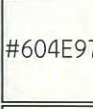

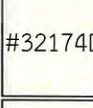

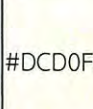
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ต่อ)

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	
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 ง

### เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ และการ mount ด้วยสี methylene blue

(บงกชวรรณ, 2550)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนแผ่นสไลด์ (slide culture technique) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากการศึกษาลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียเส้นสายมีลักษณะคล้ายเชื้อราจึงสามารถนำเทคนิค slide culture มาประยุกต์ใช้ได้ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์จะช่วยให้เห็นลักษณะของเส้นใย และการเรียงตัวของสปอร์ที่แท้จริงชัดเจน และสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้สำหรับอ้างอิง และเป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไปได้

#### ขั้นตอนการทำ

##### 1. การเตรียม sterile culture plates

- 1.1 วางสำลีปลอดเชื้อชนิดแผ่นที่กั้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร
- 1.2 วางแท่งแก้วรูปตัววี (ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ 2 ชั้นวางขนานกันแทนได้) บนกระดาษซับ
- 1.3 วางแผ่นสไลด์ที่สะอาดบนไม้พันสำลีและวางแผ่นแก้วปิดสไลด์ บนกระดาษซับ ปิดฝาจานอาหารแล้วนำทั้งชุดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้งสนิทพร้อมนำมาใช้งาน

##### 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 เตรียมอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยให้ความหนาของวุ้นประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร
- 2.2 วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทาบลงบนแผ่นตารางกระดาษที่ตีช่องขนาด 1 x 1 เซนติเมตร
- 2.3 ตัดวุ้นตามเส้นตารางด้วยใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อให้ได้ก้อนวุ้นที่มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อไป

##### 3. การ inoculate เชื้อ

- 3.1 ใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อตัดก้อนวุ้นขนาด 1 x 1 เซนติเมตร นำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารให้อยู่บริเวณกลางแผ่นสไลด์
- 3.2 ใช้ needle ปลายงอเขี่ยเชื้อจากโคลนีสขนาดประมาณหัวไม้ขีดไฟ นำไปจิ้มลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน แล้วคีบแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารปิดลงบนก้อนวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เติมน้ำกลั่นให้กระดาศับมีความชื้นทั่วแผ่นสำลี แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7 – 14 วัน จนกระทั่งเชื้อมีการเจริญของเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ตรวจสอบได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยไม่ต้องมีการย้อมสี

#### 4. การ mount สไลด์

4.1 หลังจากตรวจพบว่ามีมีการเจริญของเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ของเชื้อแล้ว ให้ใช้คีมคีบยกแผ่นกระจกปิดสไลด์ออกจากก้อนวุ้นแล้วนำแผ่นกระจกมาวางหงายบนกระดาศับแล้วหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระจกปิดสไลด์บริเวณที่มีเชื้อ เพื่อให้ลดการเกิดฟองอากาศเมื่อนำแผ่นกระจกปิดสไลด์ไป mount

4.2 หยด methylene blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 – 2 หยดแล้วคีบกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อวางทับลงไปให้แนบสนิทระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศจะได้แผ่นสไลด์ที่พร้อมนำไปส่องกับกล้องจุลทรรศน์

4.3 นำแผ่นสไลด์ไปตรวจดูรูปร่างลักษณะของเส้นใย การเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากต้องการเก็บเป็นสไลด์ถาวรให้ใช้กระดาศับที่ชุบ methylene blue ส่วนที่ล้นออก รอจนแห้งสนิทก่อนทาหีบขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บทั้งสี่ด้าน เพื่อป้องกันสีย้อม methylene blue รั่วและป้องกันการเกิดการปนเปื้อน โดยสามารถเก็บสไลด์ไว้ศึกษาได้เป็นเวลานาน

## ภาคผนวก จ

## การเตรียมสารละลายทดสอบไนเตรต

(สุรีย์, 2557)

## 1. การเตรียมสารละลาย Reagent A: Sulfalnic acid reagent

ส่วนประกอบของสารละลาย Reagent A: Sulfalnic acid reagent

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

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร Sulfanilic acid 1 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ทำการปิเปตสารละลายกรดอะซีติก 5 นอร์มอล ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ถึง 1000 มิลลิลิตร แล้วจึงผสมให้เข้ากัน

2. การเตรียมสาร Reagent C:  $\alpha$  - naphtholreagentส่วนประกอบของสารละลาย C :  $\alpha$  - naphtholreagent

alpha - naphthol	1	กรัม
Conc. Acetic Acid 5 N	200	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมโดยการนำ  $\alpha$  -naphthol 1 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ทำการปิเปตสารละลายกรดอะซีติก 5 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ส่วนสารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้น 5 นอร์มอล เตรียมได้ด้วยการเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 71.25 กรัม

วิธีการเก็บรักษา

ควรเก็บสารเคมีทั้งสองชนิด ไว้ในขวดสีชาซึ่งมีฉลากที่ใช้ในการดูตสาร

## ภาคผนวก ฉ

### การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

(โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2555)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ  $1.0 \times 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (ซึ่งเทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 ถึง 0.1 โดยทำการวัดที่ความยาวคลื่น 624 นาโนเมตร)

#### ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1 %v/v Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99.50	มิลลิลิตร
1.175 % w/v BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.50	มิลลิลิตร

#### ขั้นตอนการเตรียม

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

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารละลาย molybdenum blue spray

(K. Dynska-Kukulska *et al.*, 2013)

#### ขั้นตอนการเตรียม

##### 1. การเตรียม solution I

ชั่ง molybdenum trioxide ( $\text{MoO}_3$ ) 8.022 กรัม มาละลายใน 25N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มบน hot plate เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง เพื่อกำจัด oxide จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จะได้เป็น solution I ที่มีสีน้ำเงินอ่อน แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในขวดสีชา เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารเมื่อโดนแสง

##### 2. การเตรียม solution II

นำ solution I ที่ได้จาก ข้อ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาผสมกับผง molybdenum trioxide ( $\text{MoO}_3$ ) 0.356 กรัม นำไปต้มบน hot plate เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อกำจัด oxide จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจะได้ solution II มีสีน้ำเงินเข้ม แล้วจึงนำสารไปเก็บในขวดสีชา เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารเมื่อสัมผัสกับแสง

##### 3. การเตรียม molybdenum blue spray

เมื่อจะนำไปใช้สเปรย์บน thin – layer silica gel plates ให้ทำการผสมระหว่างสาร solution I กับ solution II ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อน้ำกลั่น 4.5 ส่วน จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม หากใช้ไม่หมดให้นำสารไปเก็บในขวดสีชา โดยจะมีอายุในการเก็บประมาณ 1 เดือน

## ภาคผนวก ซ

### ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

- จุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 1 และ 9-12 เป็นตัวอย่างดินจากป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ (Latitude 13.544307, Longitude 100.604692)
- จุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 18-28 เป็นตัวอย่างดินจากป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา (Latitude 13.541191, Longitude 100.997449)



(๑)



(๒)

รูปที่ ก แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง (๑) ป่าชายเลน ตำบล บางปู จังหวัดสมุทรปราการ (๒) ป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา



รูปที่ ข แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 1, 9, 10, 11, 12, 18, 19 และ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินตำแหน่งที่ 21, 22 , 23, 24, 25, 26, 27 และ 28

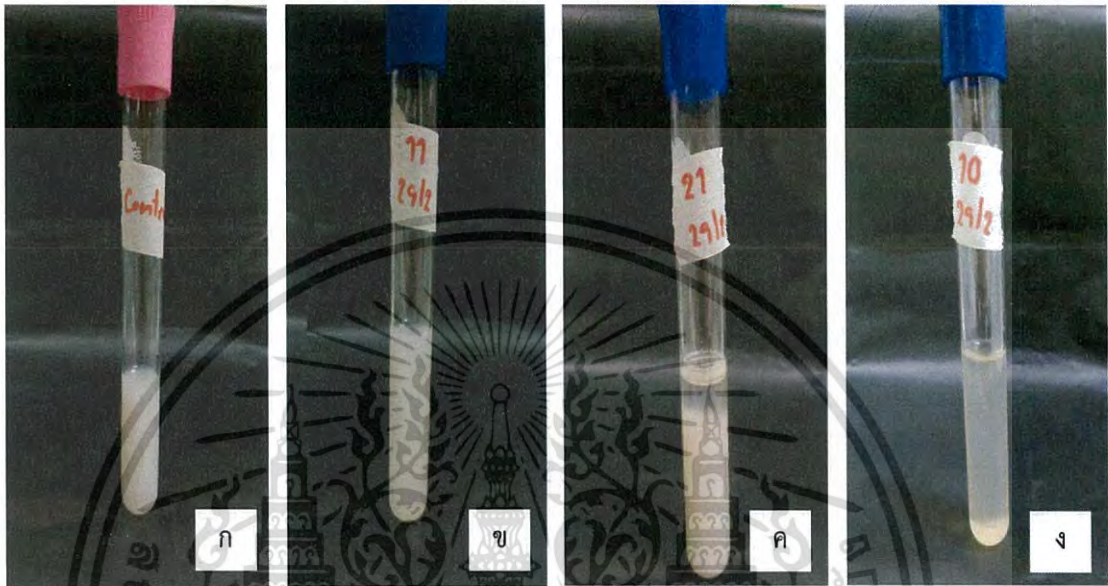
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฅ

### ภาพถ่ายแสดงตัวอย่างผลการทดสอบทางชีวเคมี

#### 1. การทดสอบการตกตะกอน และการย่อยสลายโปรตีน ในน้ำนม

##### 1.1 การทดสอบการตกตะกอน ในหลอดอาหาร Skim milk 10%



รูปที่ ฅ(๑) แสดงผลทดสอบการตกตะกอน ในหลอดอาหาร Skim milk 10%

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการตกตะกอน ในหลอดอาหาร Skim milk 10%
- (ข) แสดงผล [ - ] ไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีนที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ค) แสดงผล [ w ] เกิดการตกตะกอนของโปรตีนเล็กน้อยที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (ง) แสดงผล [ + ] เกิดการตกตะกอนของโปรตีนที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

## 1.2 การย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar



รูปที่ ๓(๒) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar

- (ก) แสดงผล [ - ] ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสี
- (ข) แสดงผล [ w ] เกิดการย่อยสลายโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสีเล็กน้อย
- (ค) แสดงผล [ + ] เกิดการย่อยสลายโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีขาวขุ่นเป็นลักษณะใสไม่มีสี

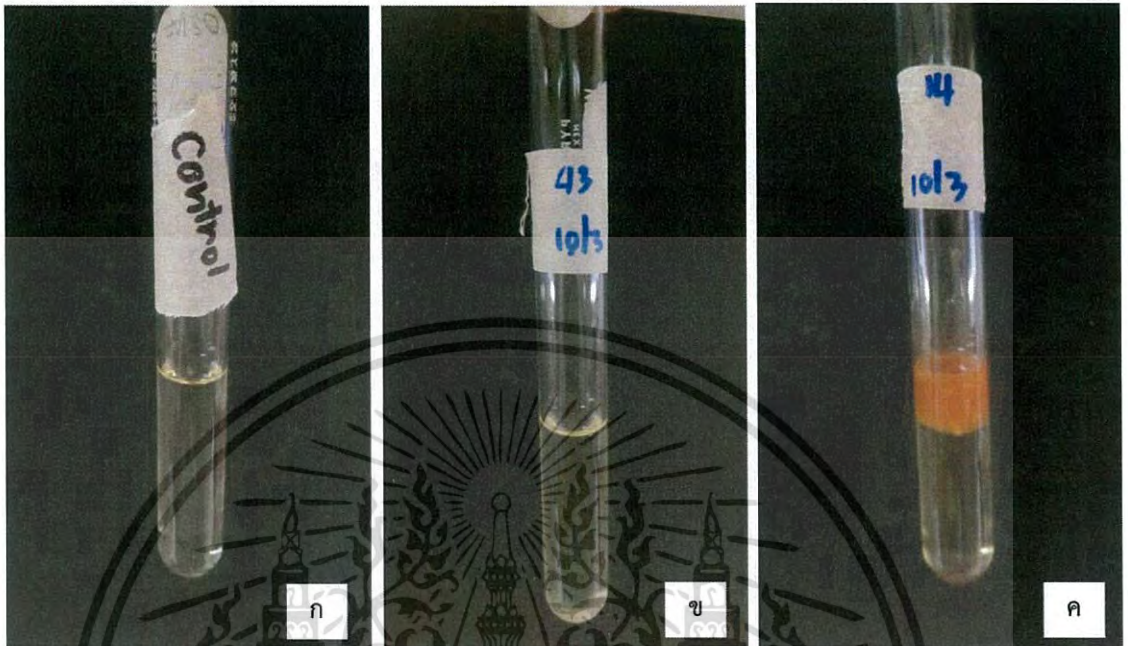
## 2. การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน



รูปที่ ๓(๓) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth  
 (ก) แสดงผล [ + ] เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth เมื่อเทียบกับชุดควบคุม  
 (ข) แสดงผล [ - ] ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

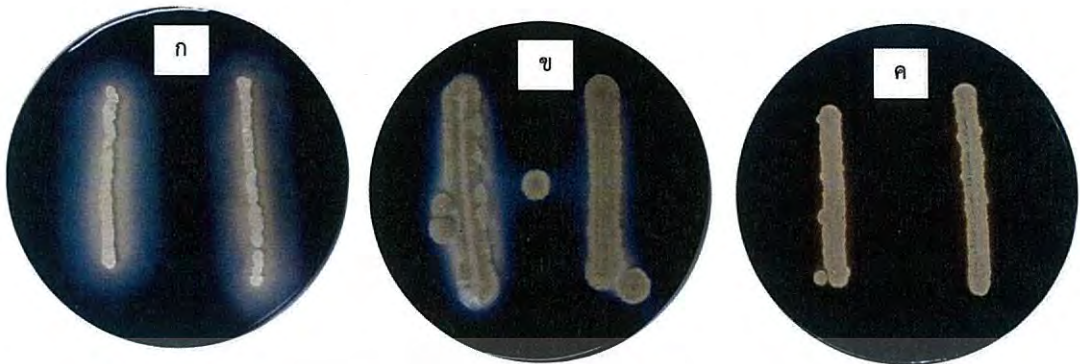
### 3. การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท



- รูปที่ ๓(๔) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth
- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth
- (ข) แสดงผล [ - ] ไม่เกิดย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth
- (ค) แสดงผล [ + ] เกิดย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4. การทดสอบการย่อยสลายแป้ง



รูปที่ ๓(๕) แสดงผลทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar

(ก) แสดงผล [ + ] เกิดย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar

(ข) แสดงผล [ w ] เกิดย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar เล็กน้อย

(ค) แสดงผล [ - ] ไม่เกิดย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar

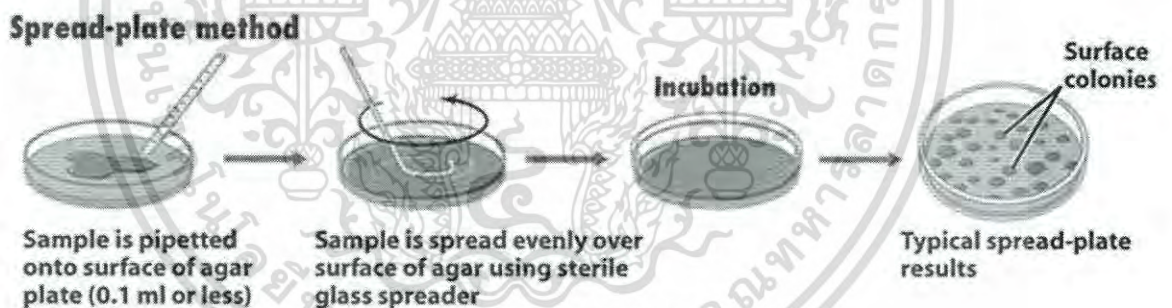


## ภาคผนวก ญ เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

(นงลักษณ์ และปรีชา, 2557)

ในแหล่งธรรมชาติต่างๆไม่ว่าจะเป็น ดิน น้ำ ตะกอน หรือเศษซากต่างๆปกติเชื้อจุลินทรีย์จะเติบโตอยู่รวมกันหลายๆสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยเทคนิคที่ทำได้ง่าย คือ

1. Spread-Plate Technique เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์โดยมีการเจือจางเป็นลำดับส่วน (serial dilution) จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจางตามต้องการโดยวิธี aseptic technique ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างลงบนอาหารวุ้นแข็ง และทำการเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารด้วย แท่งแก้วรูปตัว L โดยหลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น และโคโลนี (colony) ของจุลินทรีย์จะเจริญบนอาหารวุ้นแข็งเท่านั้น วิธีการ spread plate นี้ง่ายและสะดวกกว่าวิธี pour plate technique แต่ไม่เหมาะสำหรับจุลินทรีย์ที่ไวต่อออกซิเจน นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Streak-Plate Technique



รูปที่ ญ(๑) แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread-plate Technique

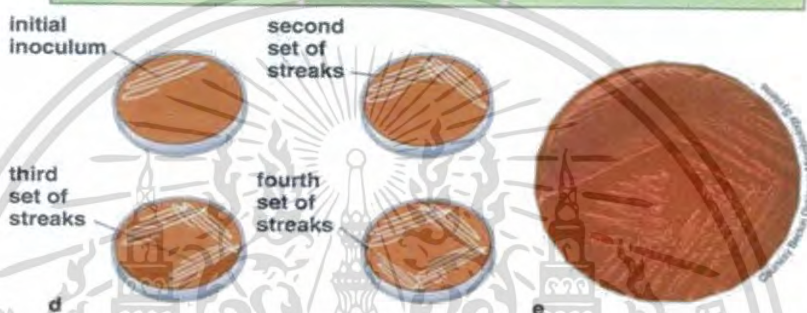
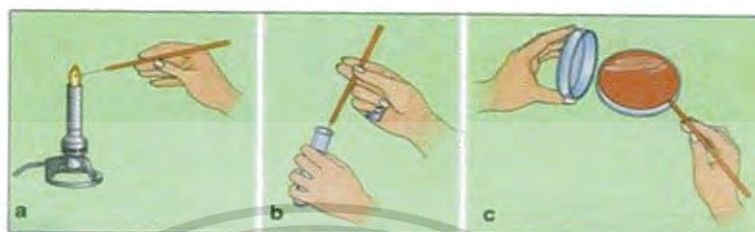
ที่มา : <http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/pharm/Microbiology%20.htm>

ค้นเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ.2559

2. Streak plate technique เป็นวิธีการที่ใช้สำหรับแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่นิยมทำกันมากที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ อากาศ และพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร และพนักงาน ที่สัมผัสกับอาหาร มีจุลินทรีย์หลายชนิด โดยวิธีนี้มีอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้ในการถ่ายเชื้อคือ ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) และตะเกียงแอลกอฮอล์สำหรับใช้ฆ่าเชื้อโดยการเผาจนห่วงเชี่ยเชื้อร้อนแดง วิธี cross streak technique ทำได้โดยใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop)แตะตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี

มีอาหารแข็ง (agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ทางวิชาการ เชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเชี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้ไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบโดยเชื้อในระนาบสุดท้ายจะเป็นระนาบที่มีความหนาแน่นของโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นน้อยที่สุด จึงเหมาะสำหรับการนำเชื้อที่ขึ้นในระนาบสุดท้ายมาทำการศึกษาทดลองต่อไป (รูปที่ ๒)



รูปที่ ๒ แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak Technique

ที่มา : <http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/pharm/Microbiology%20.htm>

ค้นเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ.2559

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นาย ธนยศ ศศิวิมลรัตน (เพชร)  
E-mail Milotic\_Milocaross@hotmail.com

### ประวัติการศึกษา

- 2554 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์)  
โรงเรียนสตรีวิทยา ๒ ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี  
กรุงเทพมหานคร
- 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กำลังศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร



ชื่อ-นามสกุล นาย ธิตวิชัย ทองดี (ไซมอน)  
E - Mail simon\_2008za@hotmail.com

### ประวัติการศึกษา

- 2552 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี
- 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์) โรงเรียนกรรณสูตศึกษาลัย  
สุพรรณบุรี
- 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร



ชื่อ-นามสกุล นางสาว นัยน์ภัค เจริญจรุชยนต์ (ภัค)  
E-Mail naiyapak\_pak@hotmail.com

### ประวัติการศึกษา

- 2554 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์)  
โรงเรียนสตรีวิทยา ๒ ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี  
กรุงเทพมหานคร
- 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้